

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/05422 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: **A61K 38/17**

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international: 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
BIOMERIEUX STELHYS [FR/FR]; Chemin de
L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): **ROECK-
LIN, Dominique** [FR/FR]; 14 Rue de la Paix, F-67500
Niederschaeffolsheim (FR). **KOLBE, Hanno** [FR/FR]; 6

Rue des Tuiliers, F-67204 Achenheim (FR). **CHARLES,
Marie-Hélène** [FR/FR]; 3 Allée de la Lamperte, F-69420
Condrieu (FR). **MALCUS, Carine** [FR/FR]; 9 Rue des
Ronzières, F-69530 Brignais (FR). **SANTORO, Lyse**
[FR/FR]; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les
Bains (FR). **PERRON, Hervé** [FR/FR]; 15 Rue de Boyer,
F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire: **DIDIER, Mireille**; Cabinet Germain et
Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06
(FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION
ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre: UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE
ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatc protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saponin B.

(57) Abrégé: Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

WO 01/05422 A2



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée:

- *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

**UTILISATION DUN POLYPEPTIDE POUR DETECTER, PREVENIR OU
TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE ASSOCIE A UNE MALADIE
DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE**

5 La présente invention concerne notamment l'utilisation d'au moins un polypeptide, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique.

 Selon l'invention, on entend par maladie dégénérative, une maladie dans
10 laquelle un processus de mort cellulaire ou de destruction cellulaire est associé à des troubles physiologiques et/ou cliniques. La maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson sont classées parmi les maladies neurodégénératives. On entend par maladie auto-immune, une hyperréactivité du système immunitaire vis à vis d'un ou de plusieurs auto-antigène(s). La sclérose en
15 plaques (SEP), la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le lupus érythémateux sont classés dans les maladies auto-immunes.

 La sclérose en plaques est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste
20 en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

 Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation
25 macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une
30 prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments
5 déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font
10 état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus
15 lésionnel.

L'étiologie de la SEP est source d'un débat d'actualité car la maladie pourrait avoir des origines diverses. Des hypothèses ont été émises sur une origine bactérienne et/ou virale. Par ailleurs, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859, H. Perron et al. ont été conduits à rechercher un ou des agents effecteurs
20 du processus pathogénique aboutissant à la formation typique de plaques de démyélinisation et à une gliose astrocytaire. Dans le cadre de cette étude, ils ont mis en évidence la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum de patients SEP d'au moins un facteur qui présente une activité toxique vis à vis des cellules astrocytaires et oligodendrocytaires humaines ou animales. Cette activité toxique se
25 caractérise par une désorganisation cytomorphologique du réseau de filaments intermédiaires et/ou une dégradation des protéines desdits filaments et/ou une mort cellulaires par apoptose des cellules gliales. Ils ont établi une corrélation significative entre la détection *in vitro* de cette activité toxique dans des échantillons de LCR et de sérum de patients SEP et la sclérose en plaques par un dosage colorimétrique
30 quantitatif au bromure de méthyltétrazolium (MTT) des cellules vivantes, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859. Par ailleurs, C. Malcus-Vocanson *et al.* ont montré que l'urine est un fluide biologique très favorable pour la détection de

l'activité de ce facteur toxique et développé un procédé utilisant la cytométrie de flux pour détecter et/ou quantifier les cellules gliales adhérentes mortes par apoptose. Toutes les informations concernant ce procédé sont décrites dans la demande de brevet WO 98/11439, dont le contenu est incorporé à titre de référence.

5 Des essais ont été réalisés à partir d'une fraction protéique de LCR et d'urine de patients SEP pour tenter d'identifier ce facteur toxique. Le contenu protéique de chaque fraction a été séparé sur gel SDS-PAGE 12 % et observé après coloration du gel à l'argent. Parmi les protéines observées, une fraction protéique centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 21 kD a été trouvée
10 minoritairement associée à l'activité toxique détectée *in vitro* et une fraction centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 17 kD a été trouvée majoritairement associée à cette activité toxique.

Une injection de la fraction provenant de LCR de patients SEP dans le cerveau de rat Lewis et une observation histologique post-mortem de coupes de
15 cerveau des rats a permis d'observer, trois mois après l'injection, une apoptose de la population astrocytaire et la formation de plaques de démyélinisation. Toutes les informations sont contenues dans la demande de brevet WO 97/33466, dont le contenu est incorporé à titre de référence. Ces observations sont conformes à celles qui ont pu être faites sur des coupes de cerveau de patients atteints de SEP, après biopsie (N.
20 Benjelloun et al. Cell. Mol. Biol., 1998, 44 (4), 579-583).

Les présents inventeurs ont maintenant identifié et analysé les protéines associées à cette activité toxique vis à vis des cellules gliales dans des échantillons biologiques de patients SEP, en particulier dans l'urine, le liquide céphalo-rachidien et le sérum.

25 Après purification des protéines et séparation sur gel SDS-TRICINE, les inventeurs ont mis en évidence la présence de quatre bandes d'intérêt de différents poids moléculaires apparents, respectivement de 8, 14, 18 et 20 kD correspondant à au moins cinq familles de protéines différentes. Les protéines de ces familles ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie
30 dans les banques de données (NCBI [http :/www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Basic Blast Search, Protein Blastp, les séquences protéiques sont entrées en format FASTA dans la base de données nr, l'algorithme utilisé est Matrix BLOSUM62, l'identité dénommée

“ Identities ” correspond au nombre d’acides aminés identiques donné en pourcentage et la positivité “ Positives ” correspond aux acides aminés présentant une équivalence biologique selon les paramètres susmentionnés du logiciel donnés en pourcentage). Ces protéines appartiennent aux familles des protéines du Perlecan, du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine B. Plus précisément, les protéines sont (i) pour la bande de 20 kD le fragment C-terminal du Perlecan qui commence à l’acide aminé 3464 et se termine à l’acide aminé 3707 (Murdoch AD et al. J Biol Chem, 1992, April 25 ;267 (12) :8544-47), et référencé dans l’identificateur de séquences SEQ ID N° 2 (la protéine entière Perlecan étant référencée en SEQ ID N°1), (ii) pour la bande de 20 kD le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (Monaco HL et al., Science, 1995, 268 (5213) :1039-1041) dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, (iii) pour la bande de 18 kD le précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 (Furst W et al., Euro J Biochem, 1990, Sep 24 ; 193(3) :709-14) identifié en SEQ ID N° 8, (iv) pour la bande de 14 kD la calgranuline B (Lagasse. E et al., Mol Cell Biol, 1988, Jun ;8(6) :2402-10) identifiée en SEQ ID N° 17 et (v) pour la bande de 8 kD la saposine B (Kleinschmidt T et al., Biol Chem Hoppe Seyler, 1988, Dec ;369(12) :1361-5) représentée en SEQ ID N° 24. Ils ont par ailleurs mis également en évidence la présence de séquences variantes auxdites séquences de référence, en particulier pour la bande de 18 kD une séquence variante du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 référencée SEQ ID N° 9. Ces séquences protéiques variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines ou sont le résultats de phénomènes d’épissage. Il est à noter par exemple que la calprotectine est un variant de la calgranuline B.

Le fragment C-terminal de la protéine Perlecan (SEQ ID N° 2) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 69, en tenant compte du code génétique. La protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 70, en tenant compte du code génétique. La protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique. Les peptides FSWDNCFEGK DPAVIR et YSLPKSEFAV PDLELP issus du polypeptide muté activateur du GM2 (SEQ ID N°9) sont codés par les

séquences nucléotidiques ADN SEQ ID N° 66 et SEQ ID N° 67 respectivement, en tenant compte du code génétique. La protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique. La protéine saposine B (SEQ ID N° 24) est codée par exemple par la

5 séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique.

Par famille de protéines on entend l'ensemble des protéines codées à partir d'un même gène d'ADN et qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage alternatif ce qui conduit à la traduction de différentes séquences primaires

10 de protéines. Toutes ces protéines appartiennent à une même famille protéique. On inclut également dans le terme " famille protéique ", les protéines qui présentent au moins 70% d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec une séquence protéique de référence de la famille.

On entend par multi-épissage, un épissage intervenant au moins une fois

15 dans la région nucléotidique d'intérêt.

Par exemple, par famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragment de protéines de séquence SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents

20 cadres de lecture.

Par exemple, par famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, et les protéines codées

25 par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents

30 cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Les protéines MRP14 (SEQ ID N° 17) et MRP8 (SEQ ID N°

18) ont une séquence protéique différente tout en étant codées par un même gène ; elles appartiennent à la même famille protéique.

Par exemple, par famille de protéine saposine B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence
5 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par famille d'acides nucléiques codant pour une protéine on entend
10 l'ensemble des séquences nucléiques ADNc et/ou ARN transcrits à partir d'un même gène ADN et, qui résultent d'un multi-épissage différentiel. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage différentiels et conduit à la synthèse de différents acides nucléiques (ADNc, ARN) de séquences différentes. Toutes ces séquences ADNc et ARNm sont considérées comme appartenant à une même famille d'acides
15 nucléiques.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquence SEQ ID N°30.

20 Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41 qui résultent d'un multi-épissage
25 différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46, SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID
30 N° 49, SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine saposine B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragment de séquences SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par « épissage » on entend un mécanisme d'excision des introns et de raboutage des exons au cours de la maturation des transcrits et par « épissage différentiel » on entend l'existence de plusieurs schémas d'épissage d'un transcrit primaire aboutissant à la formation de différents ARN messagers et, pouvant donner lieu à la synthèse de plusieurs protéines différentes (Kaplan et Delpech, Biologie Moléculaire et Médecine, 1993, 2^{ème} édition, Médecine et Sciences, Flammarion, pages 73-77). CE phénomène est largement décrit dans la littérature scientifique. A titre d'exemple, on peut citer le modèle des gènes qui codent pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, le modèle du gène de la dystrophine, le modèle du gène de l'alpha amylase, le gène de la myéline, etc...

Il est connu que les gènes eucaryotes, notamment, comprennent des régions (exons) qui codent pour des fragments de la protéine codée par ledit gène et d'autres régions (introns) qui n'ont pas d'équivalent protéique. Ceci est dû au fait que les gènes sont d'abord transcrits en un ARN « primaire » qui est ensuite coupé par des enzymes d'épissage au niveau de sites nucléotidiques spécifiques (sites d'épissage). Ces enzymes raboutent ensuite les régions codant pour la protéine, reconstituant ainsi un ARN « secondaire » dont les régions introniques ont été éliminées. Par ailleurs, selon les phénotypes cellulaires (et donc les tissus ou la différenciation) ces enzymes ne sont pas toutes exprimées et, ainsi, un même ARN peut être épissé différemment dans les cellules d'un même individu, générant ainsi des protéines avec des différences de séquence. Cependant, ces phénomènes peuvent aussi s'appliquer à des régions nucléotidiques qui sont entièrement codantes (exons), mais qui, selon différents épissages possibles vont générer plusieurs protéines différentes à partir de la même région nucléotidique, par phénomène d'épissage différentiel entre les différents produits protéiques.

De plus, il est connu que des régions nucléotidiques peuvent avoir plusieurs cadres de lecture selon les trois trames potentielles du code génétique. Ainsi,

la présence de plusieurs codons initiateurs de traduction dans plusieurs phases de lecture et/ou un épissage d'ARN primaire raboutant des séquences nucléotiques présentes dans des phases de lectures différentes sur l'ADN, permet à une même région ADN de générer des produits protéiques sans rapports entre eux, du point de vue de la séquence peptidique.

Enfin, le polymorphisme génétique existant entre les individus d'une même espèce et/ou des mutations individuelles peuvent créer ou supprimer des sites d'épissage dans une région ADN donnée et, ainsi, modifier la séquence et la structure du ou des produits protéiques normalement produits par cette région.

Ainsi, la combinaison de ces différents phénomènes peut permettre qu'une même séquence nucléotidique correspondant à un segment d'ADN, identifiée comme déterminant une région génétique d'intérêt dans une étude donnée, comprenne l'information nécessaire et suffisante pour définir toute une famille d'ARN épissés selon des schémas différentiels et alternatifs, dans des cadres de lecture divers et, par là évidemment, de protéines et de polypeptides ayant des séquences " mosaïques " selon un cadre de lecture voire selon les trois cadres potentiels et des mutations éventuellement liées au polymorphisme génétique.

Un exemple de ce phénomène peut être représenté par la région nucléotidique du gène *env* du rétrovirus HIV-1. En effet, plusieurs protéines différentes sont codées par des segments de la même séquence : par exemple, la glycoprotéine d'enveloppe, et les protéines régulatrices TAT, REV, NEF, VIF.

Il est encore connu que des protéines peuvent résulter de l'assemblage de sous-unités identiques (homodimères, homomultimères) ou différentes (hétérodimères, hétéromultimères). Ainsi, les différents produits protéiques codés par une même région ADN peuvent aussi s'assembler entre eux pour constituer des entités protéiques complexes multimériques. Ce phénomène s'ajoute aux précédents et, lorsqu'une protéine est identifiée par un fragment peptidique, on peut logiquement identifier tous les autres éléments constitutifs de cette protéine complexe et les segments ADN et ARN épissé qui les codent, ainsi que tous les membres de la famille de produits protéiques et leurs assemblages.

Un autre exemple est fourni par la région d'ADN humain codant pour la famille de protéines MRP14 ou calgranuline B, MRP8, calprotectine, psoriasine etc...

Aussi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une

composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Dans des modes de réalisation particuliers au moins deux polypeptides précités sont utilisés en combinaison pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées. Avantageusement les cinq polypeptides qui répondent à la définition précédente sont utilisés en combinaison.

De préférence, la séquence peptidique dudit polypeptide comprend, ou consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

5 L'invention concerne encore l'utilisation d'au moins un fragment d'un des polypeptiques précités pour la préparation d'un peptide immunogène, ledit peptide comprenant tout ou partie d'au moins une des séquences référencées SEQ ID N°s 58 à 65 et étant utilisé pour la production d'anticorps monoclonaux.

L'invention a également pour objet, l'utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique
10 ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N°
15 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 ET SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent
20 au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques ci dessus, et les fragments complémentaires desdits fragments, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du
25 précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Il est à la portée de l'homme du métier de déterminer les séquences nucléiques des fragments nucléotidiques à partir des séquences peptidiques et du code génétique, ceci faisant partie de ses connaissances générales.

De préférence, ledit fragment nucléotidique code pour une protéine qui à
30 l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N°s 1 à 8 et SEQ ID N°s 10 à 29 précitées, et parmi les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'au moins un fragment
5 nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi
10 l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ
15 ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique tel que défini ci dessus pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à
20 détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

Par ligand, on entend toute molécule susceptible de s'associer au polypeptide, tel que un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique, une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances
25 générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp. 449-454
30 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux.

Par ligand, on entend également toute molécule susceptible de s'associer à un fragment nucléotidique, tel qu'un fragment nucléotidique partiellement ou

totalelement complémentaire, un polynucléotide complémentaire, un anticorps anti-acides nucléiques. La production de fragments nucléotidiques ou de polynucléotides fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut notamment citer l'utilisation d'enzymes de restriction, et la synthèse chimique sur synthétiseur
5 automatique, par exemple sur des synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystem. Par ailleurs, on connaît des techniques pour la production d'anticorps anti-acides nucléiques. On peut citer à titre d'exemples Philippe Cros et al., Nucleic Acides Researc, 1994, Vol. 22, N°. 15, 2951-2957 ; Anderson, W.F. et al. (1988) Bioessays, 8 (2), 69-74 ; Lee, J.S. et al. (1984) FEBS Lett., 168, 303-306 ; Malfoy, B. et al. (1982)
10 Biochemistry, 21(22), 5463-5467 ; Stollar, B.D. et al., J.J. (eds) Methods in Enzymology, Academic Press, pp. 70-85 ; Traincard, F. et al. (1989) J. Immunol. Meth., 123, 83-91 et Traincard, F. et al. (1989) Mol. Cell. Probes, 3, 27-38).

L'invention a encore pour objet un procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon
15 biologique dans lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N°
20 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement
25 au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on
30 détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Ledit ligand est avantageusement un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur,

un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

De même, l'invention concerne un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N°s 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Le ligand est toute molécule qui répond aux conditions précédemment décrites.

De préférence, dans les procédés décrits ci dessus la séquence du polypeptide comprend ou consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 précédentes et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

L'invention concerne également un nouveau polypeptide qui comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment présentant au moins une mutation, en particulier au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Le polypeptide est

avantageusement choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

En particulier, ledit polypeptide comprend ou consiste en SEQ ID N° 9.

5 Ce polypeptide est utilisé pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini précédemment.

L'un des objet de l'invention est également un fragment nucléotidique qui
10 code pour le fragment de la protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment de ladite protéine présentant au moins une mutation, en particulier deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Ledit fragment nucléotidique, en particulier, comprend ou consiste en un fragment qui code pour SEQ ID N° 9. Ce fragment est utilisé pour obtenir une composition diagnostique,
15 pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment.

L'invention a aussi pour objet un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon
20 biologique, selon lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins le polypeptide qui comprend ou consiste en SEQ ID N° 9 ou un mélange de polypeptides comprenant ce polypeptide et au moins un polypeptide tel que décrit ci dessus, puis on détecte la formation d'un complexe ou de complexes entre le ou les polypeptides et le ou les ligands correspondants ; étant entendu que par ligand on entend une molécule
25 qui répond aux conditions précitées.

L'invention concerne également un procédé pour détecter au moins le polypeptide référence SEQ ID N° 9 ou un fragment dudit polypeptide, ce fragment comprenant au moins une et de préférence deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N°8, dans un échantillon biologique selon lequel on met en contact
30 l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. La définition de ligand correspond à celle définie précédemment. Il peut s'agir entre autres d'un

anticorps monoclonaux, d'un anticorps polyclonal, d'un substrat d'activité enzymatique, ou d'une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur, d'un récepteur.

On peut également mettre en contact l'échantillon biologique avec un ligand spécifique du polypeptide référence SEQ ID N°9 et au moins un ligand spécifique d'au moins un autre polypeptide tel que défini précédemment, puis on détecte la formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides ; étant entendu que par ligand on entend une molécule qui répond aux conditions décrites précédemment.

Un autre objet de l'invention est un fragment nucléotidique codant pour tout ou partie du polypeptide SEQ ID N° 9, et son utilisation pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment, et les fragments complémentaires desdits fragments.

Par fragment polypeptidique, on entend au moins tout ou partie de la séquence peptidique d'une protéine, en particulier un fragment polypeptique qui comprend environ entre 5 et 15 acides aminés et plus précisément environ entre 5 et 10 acides aminés et 6 et 15 acides aminés. Et par fragment nucléotidique, on entend au moins tout ou partie d'une séquence nucléotidique, étant entendu que par séquence nucléotidique, sont couvertes les séquences ADN et ARN.

En particulier, par fragment polypeptidique ou nucléotidique, on entend soit des fragments associés à une même unité moléculaire, soit des fragments dans un complexe moléculaire comprenant plusieurs sous-unités homologues ou hétérologues obtenues de manière naturelle ou artificielle, notamment par multi-épissage différentiel ou par synthèse sélective.

L'invention concerne aussi un procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini précédemment, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide biologique, on analyse par spectrométrie de

masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

La présente invention concerne également l'utilisation *d'au moins* un polypeptide de l'invention pour définir des agents efficaces thérapeutiquement, et
5 l'utilisation de ces agents pour prévenir et/ou traiter une maladie auto-immune et/ou neurologique et/ou dégénérative, en particulier la sclérose en plaques.

Ainsi, d'autres objets de l'invention sont les suivants :

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite protéine étant
10 choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23,
15 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de
20 protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour définir un matériel biologique pour la préparation d'une
25 composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID
30 N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ

ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine ;

Selon une variante avantageuse de l'une des utilisations précédentes, le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 ;

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

- Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent ;

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments
5 qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18,
10 SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits
15 fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique
20 destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent.

Avantageusement, ledit fragment nucléotidique utilisé code pour ladite protéine.

25 De préférence, la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les
30 fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du

précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Les polypeptides sont préférentiellement choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

La séquence nucléique est de préférence choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

- Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Par efficacité thérapeutique, on entend le bénéfice clinique et biologique acquis après administration d'un agent thérapeutique en vue d'une amélioration, voire

d'une guérison de la maladie. Ce bénéfice se traduit entre autre par une diminution des signes cliniques, biologiques, et des effets pathologiques de la maladie après une analyse clinique par le médecin et/ou des analyses biologiques, telles que imagerie par résonance magnétique, analyse des bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-
5 rachidien, analyse de potentiels évoqués et le test de détection de gliotoxité appelé bio-essai, dont le principe est décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 précédemment citée. Cette diminution des signes cliniques et effets pathologiques doit entraîner un bénéfice pour le patient (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Eléments de
10 statistique médicale et biologique, eds Flammarion). La maladie étudiée de préférence est la sclérose en plaques.

On entend par composition à usage prophylactique et/ou thérapeutique, toute composition qui comprend un agent thérapeutiquement efficace. Ces agents thérapeutiques sont capables (i) d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative
15 l'activité biologique et/ou la fonction des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, de préférence l'activité gliotoxique et/ou (ii) de moduler et/ou d'inhiber l'expression de ces protéines et/ou (iii) de diminuer la concentration de ces protéines dans un compartiment extracellulaire et/ou intracellulaire, et/ou de substituer une forme non pathogène à une forme pathogène, par exemple mutée, d'une de ces protéines et/ou
20 de moduler leur fixation à au moins un de leur ligand ; ledit ligand étant une molécule qui répond aux critères précédemment décrits. Différents agents thérapeutiques sont produits en suivant les approches classiques largement décrites dans la littérature. Les différents groupes d'agents thérapeutiques définis à partir des protéines d'intérêt identifiées dans cette présente invention sont décrits ci-dessous. Leur activité ou
25 efficacité prophylactique et/ou thérapeutique est évaluée *in vitro* et/ou *in vivo*.

Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique *in vitro* : des échantillons d'urine d'individus sains et de patients atteints de la sclérose en plaque, de préférence en phase active, sont testés pour leur activité gliotoxique *in vitro* en suivant le protocole du bio-essai décrit dans la demande de brevet WO 98/11439, précédemment citée. L'expérience est réalisée en parallèle en ajoutant ou non dans les
30 échantillons d'urine testés l'agent thérapeutique dont l'efficacité est à tester. Des essais sont réalisés à différentes concentrations de cet agent, et après différents temps

d'incubation avec l'échantillon, à une température d'environ 37°C ou à température ambiante, pour chaque concentration d'agent testé, avant la réalisation du test bio-essai. L'activité gliotoxique est déterminée pour chaque échantillon brut ou purifié d'urine témoin et de patient en présence ou en absence de l'agent thérapeutique testé. Un agent
5 prophylactique et/ou thérapeutique pour la sclérose en plaques est un agent qui permet une diminution ou une inhibition de l'activité gliotoxique dans un fluide biologique des patients, en particulier dans l'urine. Cette diminution ou inhibition est évaluée par rapport à l'activité gliotoxique détectée dans le fluide biologique des patients SEP en absence de l'agent testé qui fixe la borne supérieure et par rapport à l'activité
10 gliotoxique détectée dans l'urine d'individu sain qui détermine la borne inférieure (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion). L'efficacité thérapeutique de plusieurs agents peuvent être évaluée en combinaison dans un même essai.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique utilisant un modèle animal : à un animal sont injectées des fractions d'urine purifiée et/ou au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins une protéine obtenue par recombinaison génétique qui correspond à au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins un polypeptide de synthèse dont la séquence en acides aminés correspond à la séquence
20 d'au moins un polypeptide de l'invention. Les injections sont effectuées, à différentes concentrations établies, à des animaux mammifères, tels que souris ou rat, de préférence un rat Lewis selon le protocole décrit dans la demande de brevet WO97/33466 citée précédemment. A des séries d'animaux sont injectées, par voie intradermique, intraveineuse, intrathécale, intracérébrale, intramusculaire, ou autres,
25 différentes concentrations d'une fraction d'urine brute ou purifiée ou d'au moins un polypeptide et/ou une protéine, tels que définis ci-dessus. Un contrôle négatif est effectué en parallèle. L'agent prophylactique et/ou thérapeutique à évaluer et ensuite injecté à différentes concentrations et par différentes voies d'administration à un animal mammifère, de préférence à une souris ou à un rat. Les injections sont réalisées
30 en une seule dose ou en doses répétées, avec différents temps d'intervalle entre chaque administration. Quelques heures à quelques semaines après l'administration, des

échantillons biologiques, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien, de l'urine sont prélevés. Sur ces échantillons sont réalisés :

(i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai, et/ou

(ii) une mesure d'activité des polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention, seuls ou en combinaison comme décrit au moins dans : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ;
10 Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou

(iii) un dosage des polypeptides et/ou protéines d'intérêt, seuls ou en combinaison, par ELISA (Enzyme Linked-Immunsorbant Assay) et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins un des polypeptides et/ou protéines de l'invention, ou leur fragment, et/ou

15 iv) un dosage d'anticorps spécifiques des polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, seuls ou en combinaison ou le dosage d'au moins un ligand capable de se fixer aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, et/ou

(v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les polypeptides et protéines d'intérêt ou leurs fragments et tout peptide immunogène dérivant de ces polypeptides, protéines et fragments, en réalisant, par
20 exemple, un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T " helper " spécifiques de l'antigène administré ; en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque
25 l'on veut évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale pour la mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer et/ou pronostiquer un état pathologique potentiel en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par le patient contre l'antigène, les polypeptides, les protéines d'intérêt ou les fragments immunogènes dérivés de ces protéines.

30 Par « ligand capable de se fixer à une protéine », on entend toute molécule capable de reconnaître la protéine ou une partie de la protéine. Cela peut être vérifié par exemple *in vitro* par tests Elisa et/ou Western blot .

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'animal est ensuite sacrifié et des coupes histologiques de différents tissus sont réalisées, de préférence des coupes de cerveaux. Différentes études et observations sont réalisées pour détecter et/ou quantifier les effets caractéristiques des polypeptides et/ou protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales, et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, et/ou une démyélinisation. La présence ou l'expression des polypeptides et/ou protéines d'intérêt identifiées est également observée et/ou quantifiée dans ces tissus :

- (i) par des analyses d'immunohistologie classiques en utilisant des ligands des polypeptides et/ou protéines d'intérêt et/ou leurs fragments et/ou des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou des fragments desdits qui se lient aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt, ou à leurs fragments, et/ou
- (ii) par des techniques d'hybridation *in situ* classiques en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des oligonucléotides définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt ; et/ou
- (iii) par des techniques d'amplification par PCR et/ou RT-PCR *in situ* en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des amorces définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt.

Par anticorps capable de se fixer à un polypeptide, à une protéine ou à leurs fragments, on entend tout anticorps monoclonal ou polyclonal et tout fragment

desdits anticorps capable de reconnaître le polypeptide, la protéine ou leurs fragments. La capacité des anticorps à reconnaître lesdits polypeptides, protéines ou leurs fragments est vérifiée *in vitro*, par exemple en ELISA et/ou Western Blot. Un anticorps capable de se fixer à la protéine saposine B (SEQ ID N° 24) ou à tout
5 fragment de cette protéine est décrit par Misasi et al. 1998, J. NeuroChem. 71 : 2313 et Klein et al. 1994, BBRC 200 : 1440-1448 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles, par exemple celles référencées précédemment pour la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, par immunisation à partir de la protéine naturelle, d'une protéine recombinante, d'un polypeptide de synthèse ou de leurs
10 fragments. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-saposine B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 61 et SEQ ID N° 62.

Par exemple, un anticorps capable de se fixer à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) ou à tout fragment de cette protéine est illustré par Yuziuk *et al.*,
15 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles connues de l'homme de l'art. Cet anticorps peut être par exemple produit après injection à des souris ou lapin de la protéine naturelle ou tout fragment, et/ou de la protéine recombinante ou tout fragment, et/ou de peptides définis et synthétisés à partir de la séquence protéique de la protéine. Les peptides immunogènes
20 utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux anti-GM2 sont les peptides références SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 60. Un anticorps capable de se fixer à la protéine Galgranuline B (SEQ ID N° 17) ou à tout fragment de cette protéine est décrit par Saintigny *et al.*, 1992 J Invest Dermatol 99 : 639-644 et Goebeler et al 1994 J Leukoc Biol 55 : 259-261, ou peut être produit en utilisant les méthodes
25 conventionnelles. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-calgranuline B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 63, SEQ ID N° 64 et SEQ ID N° 65. Un anticorps capable de se fixer à la protéine mutée activatrice du GM2 (SEQ ID N°9) ou à tout fragment de cette protéine peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles définies ci dessus.

30 Par protéine naturelle et fragment, on entend toute protéine isolée, purifiée totalement ou partiellement obtenue à partir d'échantillon humain ou animal et tout fragment obtenu à partir de cette protéine. Par exemple, on obtient la protéine naturelle

correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) en suivant la technique décrite par Waring et al. 1998 Mol Genet Metab 63 : 14-25 ; la protéine naturelle correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) en suivant la technique décrite par DeGasperi et al., 1989 Biochem J 260 : 777-783, Vogel et al., 1987 Arch Biochem Biophys 259 : 627-638, Mitsuyama, 1983 Hokkaido Igaku Zasshi 58 : 502-512 ;
5 Hirabayashi et al 1983 J Neurochem 40 : 168-175, Conzelmann et al, 1979 Hoppe Seylers Z Physiol Chem 360 : 1837-1849, Li et al., 1976 J Biol Chem 251 : 1159-1163. La protéine naturelle correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) est obtenue en suivant la technique décrite par Hitomi et al. 1996 J Cell Sci 109 : 805-815, Van den
10 Bos et al. 1998 Protein Expr Purif 13 : 313-318 et Raftery et al. 1996 Biochem J 316 : 285-293.

Par protéine recombinante ou fragment d'une protéine recombinante, on fait référence à toute protéine ou fragment de protéine produit dans une cellule procaryote ou eucaryote à partir d'une séquence nucléotidique codant pour la protéine
15 ou son fragment et transfectée dans la cellule, cette protéine ou son fragment étant ensuite purifiée. D'une manière générale, toute cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote peut être utilisée dans le cadre de la présente invention, mais les cellules issues d'organismes eucaryotes sont préférées. On peut citer à titre d'exemple les cellules CHO, les cellules COS, les cellules Semliki. Aux fins de la présente invention,
20 ladite cellule peut être sauvage ou mutante. Par exemple, la protéine recombinante correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) peut être obtenue en suivant les techniques décrites par Zaltash et al. 1998 Bebbs letter 423 : 1-4 et Qi et al. 1994 J Biol Chem 269 : 16746-16753. Une telle protéine recombinante est au moins disponible auprès de Kase et al. 1996 Febs Lett 393 : 74-76. La protéine recombinante
25 correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) peut être produite par les techniques décrites par Yuziuk et al. 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 et Bierfreund et al., 1999 Neurochem Res 24 : 295-300. La protéine recombinante correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) peut être obtenue selon le protocole de Longbottom et al. 1992 Biochim Biophys Acta 1120 : 215-222, Raftery et al. 1999 Protein Expr Purif
30 15 : 228-235. Une telle protéine recombinante est disponible au moins auprès de Klempt et al. 1997 Febs Letter 408 : 81-84.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N°24), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 53 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N° 24), on entend toute séquence déduite de la séquence d'ADN
5 SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 31 ou un fragment de cette séquence. Par
10 séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 42 ou un fragment de cette séquence. Par
15 séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence ou fragment nucléotidique codant pour tout ou partie de la protéine mutée (SEQ ID N° 9), on entend la séquence d'acides nucléiques déduite de la séquence SEQ ID N° 9, en tenant compte du code génétique. Par séquence ou fragment
20 nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de cette protéine mutée B (SEQ ID N° 9), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN, en tenant compte du code
25 génétique et des phénomènes d'épissage.

Par activité protéique, on entend une fonction caractéristique biologique de la protéine. Cette activité protéique peut être mise en évidence par des techniques connues de l'homme de l'art. Par exemple, l'activité de la saposine B (SEQ ID N° 24) et des protéines de la famille de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), peut
30 être détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634,; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591, Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 et Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159. Par activité de la

protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) et des protéines de la même famille (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Kase et al., 1996, Febs Letters 393 : 74-76, Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 et O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308. Par activité de la calgranuline B (SEQ ID N° 17) et les protéines de la même famille de la calgranuline b (par exemple SEQ ID N° 18 à 23) et toute, on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 et Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454.

L'obtention d'un modèle animal transgénique, de préférence murin, pour une pathologie humaine est techniquement réalisable. Brièvement, l'animal transgénique est produit en utilisant les techniques conventionnelles décrites et possède intégré dans son génome les acides nucléiques codant pour les protéines ou leurs fragments.

Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique et suivi thérapeutique *ex vivo*, chez l'homme :

les agents thérapeutiques à tester pour une activité thérapeutique et/ou pour un suivi thérapeutique sont administrés par différentes voies à l'homme, telles que les voies intradermique, intraveineuse, intramusculaire, intracérébrale, orale, ou autres.

Différentes doses sont administrées à l'être humain. Le dossier clinique du patient au moment de la première administration est parfaitement connu. Une ou plusieurs administrations peuvent être réalisées avec des temps d'intervalle différents entre chaque administration pouvant aller de quelques jours à quelques années. Des échantillons biologiques sont prélevés à des intervalles de temps déterminés après administration de l'agent thérapeutique, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien et de l'urine. Différentes analyses sont réalisées à partir de ces échantillons. Juste avant la première administration de l'agent thérapeutique, ces prélèvements et ces mêmes analyses sont également réalisés. Un examen clinique et biologique classique (IRM, bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien, potentiels évoqués) est réalisé également en parallèle des analyses supplémentaires qui sont être décrites ci dessous, à différentes temps de l'analyse. Les analyses réalisées sont :

(i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai à partir d'échantillons de sérum, de LCR et d'urine, et/ou

(ii) une mesure d'activité des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention seules ou en combinaison comme décrit par exemple par : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, Febs Letters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ; Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou

(iii) un dosage des protéines d'intérêt ou de leurs fragments, seuls ou en combinaison, dans les échantillons de sang/sérum, LCR, urine par ELISA et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins une des protéines ou à un de leur fragment, et/ou

(iv) un dosage d'anticorps spécifiques des protéines d'intérêt ou de leurs fragments dans des échantillons de sang/sérum, LCR, urine, par ELISA et/ou Western blot en utilisant une protéine naturelle ou un fragment de la protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou un fragment de cette protéine recombinante, seuls ou en combinaison. De même un dosage de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées, seules ou en combinaison, peut être réalisé, et/ou

(v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les protéines d'intérêt et tout peptide immunogène dérivant de ces protéines, par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T spécifiques de l'antigène administré (exemple). Par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T helper spécifiques de l'antigène administré (exemple) ; Par exemple en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque l'on souhaite évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer un état pathologique potentiel chez un patient en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par ledit patient contre l'antigène les protéines d'intérêt ou tout fragment immunogène dérivés de ces protéines, seuls ou en combinaison, et/ou

(vi) une détection de fragments d'ADN et/ou d'ARN codant pour les protéines ou un fragment des protéines d'intérêt par hybridation nucléotidique selon les techniques bien

connues de l'homme de l'art (Southern blot, Northern blot, ELOSA " Enzyme-Linked Oligosorbent Assay " (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res., 1993 Dec ; 54 (12) :2021-6 et François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, June 1993, p1444-1449)) et/ou par méthode d'amplification de l'ADN et/ou l'ARN , par exemple par PCR, RT-PCR, en utilisant des fragments d'acides nucléiques codant pour la séquence des protéines d'intérêt, et/ou

(vii) par biopsie de tissus, de préférence du cerveau, et l'observation des effets caractéristiques des protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique et/ou l'observation de phénomènes de démyélinisation, et/ou

(viii) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de la présence des protéines d'intérêt et l'estimation de leur expression par observation immunohistologique sur des coupes histologiques réalisées à partir des tissus, en utilisant des ligands et/ou des anticorps ou leurs fragments capables de se fixer aux protéines d'intérêt, et/ou

(ix) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de l'expression des protéines d'intérêt par hybridation in situ des molécules d'ARN codant pour les protéines d'intérêt en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt, et/ou

(x) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), la détermination de l'expression des protéines d'intérêt par amplification de ces ARN par des techniques classiques, comme par exemple, la RT-PCR, en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à

23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

5 On désigne par séquence d'acides nucléiques ADN ou fragments codant pour les 'polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention' la séquence d'acides nucléiques codant pour le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), la séquence d'acides nucléiques codant pour le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N° 31) codant pour la
10 protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la séquence d'acides nucléique (SEQ ID N° 42) codant pour la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N°53) codant pour la saposine B (SEQ ID N° 24), les séquences d'acides nucléiques ADN et/ou ARN (SEQ ID N° 30 à 57) codant pour les
15 protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments
20 appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29).

Une protéine ou un variant d'une protéine choisie plus particulièrement parmi les séquences définies dans les identificateurs SEQ ID N°s 2, 4, 8, 9, 17 et 24 ou leurs fragments, ou parmi les séquences correspondant aux protéines des familles de ces dites séquences (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ
25 ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 24, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison, présente un effet toxique directement ou indirectement, vis à vis de cellules, en particulier vis à vis des
30 cellules gliales, qui est mis en évidence par le bio-essai précité. Les auto-anticorps produits en réponse à la présence de cette protéine ou de ces protéines sont associés au processus auto-immun. Ainsi, la cible du ou des agent(s) thérapeutique(s) est par

exemple (i) la protéine naturelle ou les protéines naturelles ou leurs variants dans le but de réguler leur expression et/ou leur concentration intracellulaire et/ou leur concentration dans la circulation, (ii) un anticorps spécifique d'au moins une telle protéine. L'agent thérapeutique ou les agents thérapeutiques définis éliminent la cible
5 directement, par induction d'une réponse immunitaire spécifique et/ou la neutralisent.

La présente invention concerne donc un matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de mammifères atteints de pathologies dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant :

10 (i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de
15 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,
20 indépendamment ou en combinaison,

(ii) soit au moins un ligand spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie
25 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au
30 moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et
5 davantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iv) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique dont la séquence nucléique est déduite des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des protéines dont les séquences sont
15 référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, en association avec des éléments assurant
20 l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par la séquence nucléique du gène d'intérêt thérapeutique,

(v) soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement la protéine d'intérêt ou les protéines d'intérêt ou tout fragment de cette
25 ou de ces protéine(s) ou des anticorps spécifiques d'au moins une desdites protéines ou de ses fragments ladite cellule mammifère étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence d'acide nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques issus d'un même gène ou de gènes différents, la ou
30 lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et ARN codant pour les protéines référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines

appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie de la protéine d'intérêt, d'un fragment de la protéine d'intérêt ou d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère (Toes et al., 1997,PNAS 94 : 14660-14665). La composition pharmaceutique peut contenir un agent thérapeutique seul dirigé contre une cible seule ou des agents pris en combinaison dirigés contre plusieurs cibles.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N° 2), le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

A partir des connaissances des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, il est à la portée de l'homme de l'art de définir et utiliser les molécules décrites ci dessus et/ou toute molécule capable de se fixer au dites molécules, et/ou toute molécule capable d'inhiber lesdites molécules. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de protéines naturelles et/ou recombinantes et/ou de polypeptides de synthèse et leurs fragments, de ligand capables de se fixer au dites protéines ou à leur(s) fragment(s), par exemple des anticorps ; de protéines inhibitrices de la fonction et/ou de l'expression et/ou de la fixation desdites protéines.

Utilisation de protéine(s) et/ou peptide(s) naturel(s) et/ou de protéine(s) recombinante(s) et/ou de polypeptide(s) de synthèse correspondant aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation
5 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante et/ou un polypeptide de synthèse choisi parmi les protéines dont les séquences en acides aminés sont référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences
10 peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui
15 présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seules ou en combinaison,

(ii) soit au moins un fragment naturel et/ou synthétique de ces protéines d'intérêt, par exemple un fragment immunogène capable d'induire une réponse
20 immune contre un polypeptide cible,

(iii) soit au moins un peptide mimotope défini à partir des séquences de référence SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur
25 de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou une
30 combinaison de mimotopes, capable d'induire une réponse immune contre le polypeptide cible,

(iv) soit au moins toute protéine ou peptide pouvant réguler *in vivo* la transcription et/ou la traduction des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. L'administration de ces protéines et/ou peptides seuls ou en combinaison peut rétablir la concentration d'une protéine d'intérêt dans l'organisme.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humorale), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T « helper », notamment les lymphocytes T CD4+ (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponse se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC). 1) Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T helper), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines, la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). 2)

Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMHI, et b) éventuellement par les cytokines produites par les CD4+.

La présente invention concerne l'administration d'une protéine ou d'un peptide dérivés des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) ou de leur(s) fragment(s), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seuls ou en combinaison, pour la prophylaxie et/ou la thérapie d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques. Ces protéines et peptides administrés sont caractérisés en ce que ils doivent avoir perdu leur activité toxique, par exemple leur activité gliotoxique, ou avoir perdu leur capacité à se fixer à un ligand, et peuvent induire significativement une réponse immune médiée par les lymphocytes T ou/et les anticorps dirigée contre cette protéine sont utilisés. De telles protéines sont dites 'modifiées', cependant leur immunogénicité est conservée. De telles molécules immunogéniques modifiées sont obtenues par un nombre de traitements conventionnels, par exemple la dénaturation chimique ou à la chaleur, la troncation ou la mutation avec délétion, insertion ou emplacement d'acides aminés. Un exemple de troncation consiste en la troncation d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale pouvant aller jusqu'à 5-30 acides aminés. Les molécules modifiées peuvent être obtenues par des techniques synthétiques ou/et recombinantes ou par des traitements chimiques ou physiques des molécules naturelles.

Les protéines d'intérêt naturelles et/ou recombinantes identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 25), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), sont utilisées en vaccination prophylactique et thérapeutique contre les maladies auto-immunes, de préférence la SEP. Un vaccin comprend une quantité immunogénique effective de la protéine immunogène en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant et/ou un diluant. Les véhicules, adjuvants et diluants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence le Remington's Pharmaceutical Sciences. L'utilisation de compositions vaccinales est particulièrement avantageuse en association avec un diagnostic précoce de la maladie. La protéine immunogène est utilisée dans la préparation de médicament pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique. Les protéines d'intérêt peuvent être éliminées de l'organisme sans induire d'effets secondaires indésirables. L'identification de telles protéines ou peptides vaccins est réalisée comme suit : les molécules candidates modifiées comme décrit précédemment (protéines naturelles, recombinantes, peptides) sont analysées dans un test fonctionnel pour vérifier qu'elles ont perdues leur toxicité, par exemple leur activité gliotoxique en utilisant le test appelé bio-essai, et pour vérifier leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et (ii) en mesurant entre autre le taux d'anticorps circulants dirigés contre la protéine naturelle. Ces formes modifiées sont utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standard avec des adjuvants appropriés.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des

équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents “wetting” ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l’hydroxide d’aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l’immunogénicité. Les vaccins sont administrés conventionnellement par injection par exemple sous cutanée ou intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d’autres modes d’administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

En général la concentration du polynucléotide dans la composition utilisée pour une administration *in vivo* est de 0.1 µg /ml jusqu’à 20 mg /ml. Le polynucléotide peut être homologue ou hétérologue de la cellule cible dans laquelle il va être introduit.

La présente invention concerne également l’utilisation de vaccins incluant des molécules d’acides nucléiques qui codent pour les protéines d’intérêt ou des peptides immunogènes ou leur fragment(s), non actifs, correspondant aux protéines d’intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d’identité de préférence au moins 80 % d’identité et avantageusement au moins 98 % d’identité avec l’une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Les vaccins d’acides nucléiques, en particulier les vaccins ADN, sont administrés généralement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable en injection intramusculaire.

A partir de la séquence en acides aminés des protéines d’intérêt décrites (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23,

SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, des peptides ou des fragments correspondant à tout ou partie de la séquence primaire de ces protéines peuvent être synthétisés par des méthodes classiques de synthèse peptidique ou obtenus par recombinaison génétique.

Des protéines recombinantes correspondante aux protéines d'intérêt, produites dans un système cellulaire procaryote ou eucaryote, sont disponibles auprès de différentes équipes et sont décrites dans la littérature. Elles peuvent être également produite par l'homme du métier à partir de la connaissance des séquences des gènes correspondants décrits dans la littérature et en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Toutes les séquences protéiques identifiées dans la présente invention sont ainsi susceptibles d'être obtenues par recombinaison génétique. Les gènes sont clonés dans des vecteurs adaptés. Des vecteurs différents sont utilisés pour transformer des cellules procaryotes (par exemple *E. coli*) et des cellules eucaryotes (par exemple cellules COS, CHO et cellules Simliki). Les protéines recombinantes correspondant aux protéines d'intérêt ou à des fragments des protéines d'intérêt peuvent être ainsi produits dans des systèmes cellulaires procaryotes et/ou eucaryotes. Dans les cellules *E. coli*, les protéines recombinantes sont produites avec une queue poly-histidine. La fraction protéique insoluble est solubilisée dans de l'urée 8M. L'enrichissement du produit a été effectué sur résine chélatée au nickel (Qiagen). La colonne a été lavée avec des concentrations décroissantes d'urée. L'élution a été faite avec de l'imidazole en l'absence d'urée. La séquence complète des protéines d'intérêt peut être également clonée dans un plasmide adapté puis transférée dans le virus de la vaccine pour obtenir un virus recombinant.

Utilisation de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins un ligand capable de se fixer aux protéines et/ou fragments des protéines choisies parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et

24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, le ligand étant capable ou non d'inhiber l'activité protéique,

(ii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un de ses fragments choisie parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Cet anticorps peut être ou non neutralisant, c'est-à-dire capable ou non d'inhiber l'activité de la protéine d'intérêt. Le ligand peut être choisi parmi toute molécule ou fragment molécule capable de se fixer aux protéines cibles, par exemple les récepteurs de ce protéines, les cofacteurs de ces protéines, les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer aux protéines ou tout fragment de ces protéines.

Ces anticorps sont très utiles notamment pour permettent la mise en œuvre de compositions thérapeutiques car ils conduisent par exemple, à des réactions immunes, dirigées spécifiquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. On administre chez le patient soit des anticorps solubles neutralisants pour inhiber leur fonction, soit des anticorps solubles spécifiques pour éliminer le peptide par formation de complexes immuns. L'invention décrit l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement au moins une protéine décrite dans la présente invention pour le traitement et /ou pour le suivi

thérapeutique de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques. Ces anticorps sont polyclonaux et de préférence monoclonaux. De préférence ces anticorps reconnaissent le site actif de la protéine et en se fixant, inhibe la fonction de la protéine. La capacité de l'anticorps à se fixer spécifiquement à la protéine est analysé par des techniques conventionnelle décrites, comme par exemple par des tests ELISA ou de Western blot en utilisant la protéine ou le peptide immunogène naturel ou synthétique. Le titre de l'anticorps est déterminé. La capacité de l'anticorps à neutraliser la fonction de la protéine peut être analysée par différents moyen, par exemple en déterminant la diminution de l'activité de la protéine ou du peptide immunogène en présence de l'anticorps, de préférence en déterminant la diminution de l'activité gliotoxique en utilisant le test bio-essai *in vitro*.

Par exemple, les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine cible ou une partie de cette protéine sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface. Des souris ou des lapins sont immunisées (i) soit avec la protéine naturelle ou recombinante d'intérêt, (ii) soit avec tout peptide immunogène de cette protéine d'intérêt, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène est également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des protéines d'intérêt. Par exemple, l'immunogène suivant a été préparé : les peptides SEQ ID N°s 58, 59, 60 issus de la séquence du précurseur du ganglioside GM2, les peptides SEQ ID N°s 61, 62 issus de la séquence de la saposine B et les peptides SEQ ID N°s 63, 64, 65 issus de la calgranuline B ont été couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole, en abrégé peptide-KLH, comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine de sérique humaine, en abrégé peptide-HSA. Les animaux ont été soumis à une injection de peptide-KLH ou de peptide-HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide ont été analysés pour la présence d'anticorps anti-protéines par un test ELISA utilisant les protéines initiales. Les cellules spléniques de ces souris ont par conséquent été récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les

anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprécipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur rendement. Un nombre suffisant d'anticorps anti-protéines sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la protéine d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la protéine d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de « CDR grafting » (protocole réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques.

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères, produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention.

Utilisation de molécules inhibitrices des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant (i) soit au moins une molécule inhibitrice de la fonction d'au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple inhibitrice de l'activité gliotoxique, (ii) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple pour bloquer la transcription ou la traduction, (iii) soit au moins une molécule régulatrice du métabolisme d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression et/ou du métabolisme d'un ligand d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple un récepteur ou un cofacteur. On peut penser que ces protéines de l'organisme humain peuvent être inhibées sans effet secondaire.

5 Un autre aspect important de l'invention concerne l'identification et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de substances naturelles et/ou synthétiques (i) capables de bloquer et/ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt de l'invention et/ou de leur fragment : SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies
10 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au
15 moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29 et/ou (ii) capables d'inhiber leur métabolisme tels les inhibiteurs du métabolisme correspondant, les inhibiteurs d'enzymes activées par les coenzymes, (iii) capables de réguler l'expression des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même
20 famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %
25 d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) capables d'inhiber la fonction et/ou l'expression des ligands des protéines d'intérêt SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique
30 de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences

peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, comme par exemple des récepteurs. Ces substances peuvent être utilisées dans des traitements prophylactiques et thérapeutiques de la maladie. L'invention concerne également des méthodes pour traiter et prévenir une maladie auto-immune, par exemple la SEP, en administrant des quantités effectives de ces substances. Les substances peuvent être des protéines, des anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides etc... Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces substances en association avec des carriers physiologiques acceptables, et des méthodes pour la préparation de médicaments à utiliser en thérapie ou en prévention de maladies auto-immunes dont la SEP en utilisant ces substances.

Pour identifier des molécules inhibitrices de faible poids moléculaire comme des drogues candidates pour les maladies dégénératives et/ou neurologiques et/ou auto-immunes, telles que la sclérose en plaques, on utilise les tests et protocoles décrits dans précédemment et dans les demandes de brevet incorporés à titre de référence, en utilisant des échantillons prélevés du patient non traité ou traité, du modèle animal non traité ou traité, ou de tissus du modèle animal non traité ou traité. Cet aspect de l'invention inclut également un procédé pour identifier des substances capables de bloquer ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt, comprenant l'introduction de ces substances dans un test *in vitro* ou dans un modèle animal *in vivo*. Les molécules sélectionnées sont testées à différentes concentrations. Ces inhibiteurs sont aussi testés dans des essais de toxicité et pharmacocinétique pour savoir si ils peuvent représenter des drogues candidates valables. Les substances testées pour l'inhibition ou le blocage des activités protéiques ou de l'expression des protéines, dans ces procédures de criblage peuvent être des protéines, des anticorps, des fragments d'anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines d'intérêt, etc Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques.

A titre d'exemple, on peut citer comme substances inhibitrices :

Les inhibiteurs des protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les inhibiteurs des fragments desdites protéines. Ces inhibiteurs peuvent être compris dans une composition prophylactique et thérapeutique, en particulier pour le traitement de la sclérose en plaques. Par exemple, la lycorine, alcaloïde extrait de Amaryllidaceae (ex : Crinum Asiaticum) est utilisée *in vitro* à une concentration comprise entre 0.1 et 0.5 µg /ml et *in vivo* à une concentration comprise entre 0.1 et 1 mg / kg /jour. Par exemple, le Rolipram (nom commercial) et l'Ibudilast (nom commercial), qui sont deux molécules de la même famille des inhibiteurs des phosphodiesterases 4(PDE4) sont utilisées *in vitro* à des concentrations comprises entre 1 et 10 µM/l et *in vivo* à des concentrations comprises entre environ 10 mg/kg/jour.

↗ A partir des séquences d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24_ et des séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29)_il est évident que l'on peut déduire les séquences nucléotidiques ADN et ARN (SEQ ID N° 30, 31, 42, 53) correspondant aux protéines d'intérêt et les séquences codant pour les protéines de la famille de ces protéines d'intérêt (par exemple SEQ ID N° 32 à 41, SEQ ID N° 43 à 52, SEQ ID N° 54 à 57, SEQ ID N° 66 à 67), en tenant compte du code génétique et de sa dégénérescence. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de ces séquences nucléotidiques sous forme :

- de séquences anti-sens,
- de séquences codant pour un gène thérapeutique,

- de séquences pouvant être contenue dans un vecteur pour la réalisation de transformation cellulaire ex vitro et/ou in vivo (thérapie génique).

Utilisation d'acides nucléiques déduits des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention ; acides nucléiques anti-
5 sens et/ou codant pour un gène thérapeutique.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, en particulier la sclérose en plaques, la composition comprenant (i) soit au moins une séquence d'acide
10 nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B
15 (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), (ii) soit au moins une séquence d'acide nucléique
20 comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique codant pour les protéines ou un fragment de protéines (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B
25 (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles
30 destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence nucléique.

Par séquence d'acide nucléique, on entend un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de

synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messager. Ces séquences d'acides nucléiques sont déduites de la séquence d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les acides nucléiques adaptés.

Aussi, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques comprenant au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s) (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'invention consiste à définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s). Ces fragments correspondent à des molécules anti-sens ou ribozyme et peuvent être synthétisés à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que

ceux commercialisés par la société Applied Biosystem. L'invention décrit l'utilisation de ces acides nucléiques capables de s'hybrider dans des conditions stringentes à l'ADN ou/et ARN codant pour les protéines de l'invention ou pour leu(s) fragment(s). Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une
5 combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T_m (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. De telles molécules sont synthétisées et peuvent être marquées en utilisant des méthodes de marquage conventionnelles utilisées pour les sondes moléculaires, ou peuvent être utilisées comme amorces dans les réactions d'amplification. Les séquences qui
10 présentent au moins 90% d'homologie par rapport à une séquence de référence font également partie de l'invention, de même que les fragments de ces séquences qui présentent au moins 20 nucléotides et de préférence 30 nucléotides contigus homologues par rapport à une séquence de référence. Afin de réduire la proportion de peptides naturels ou variants, il est possible d'envisager une approche anti-sens et/ou
15 ribozyme. Une telle approche est largement décrite dans la littérature. Bien entendu, de telles molécules anti-sens peuvent constituer en tant que telles des vecteurs. On peut également utiliser des vecteurs qui comprennent une séquence d'acides nucléique qui code pour un anti-sens.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation
20 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite composition comprenant au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement
25 modifiées par ladite séquence nucléique.

Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs (anti-sens ou codant pour une protéine ou un fragment d'une protéine) permettent de cibler les cellules dans lesquelles le peptide est exprimé, telles que les cellules macrophages : (i) soit par l'utilisation d'une molécule de ciblage introduite sur le vecteur, (ii) soit par l'utilisation
30 d'une propriété particulière de ces cellules.

Utilisation de vecteurs comprenant un gène d'intérêt thérapeutique correspondant aux gènes des protéine d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telles que la sclérose en plaques, la composition comprenant une séquence d'acide nucléique comprenant un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Les gènes peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que la spermine.

Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut notamment s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que

ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible du mammifère génétiquement modifiée et soit capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule,

5 (iii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine ou de ses fragments, ladite protéine étant choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de
10 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; les
15 protéines inhibitrices de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
20 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iv) soit au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se
25 fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
30 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps, on entend les fragments F(ab)₂, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 ;
5 Bird et al., 1988 Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, par exemple, un dérivé chimérique d'un tel anticorps (voir par exemple les chimères des anticorps antiCD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996 J Biochem 120 : 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al 1989, Nature 339 : 394-397). Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la
10 région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés (polypeptide transmembranaire)
15 permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour un dit
20 polypeptide transmembranaire.

Par éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les
25 séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la
30 vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un

type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée.

De même dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques « neutres » ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (référence : demande de brevet PCT WO 94/29471).

Ledit acide nucléique peut également comprendre des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réplication et/ou pour l'intégration, pour la transcription et/ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art.

Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique est une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, selon un second mode de réalisation de l'invention, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un « vecteur », et plus particulièrement sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide

nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tétraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers tels que les cellules cytotoxiques et les cellules présentatrices de l'antigène). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés.

Utilisation de cellules transformées *in vivo* après injection de vecteurs contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique défini à partir des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %

d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de mammifères atteint de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins un vecteur contenant un gène thérapeutique comme décrit ci-dessous, capable d'être introduit dans une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène d'intérêt thérapeutique *in vivo*. L'avantage de cette invention repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal de molécules exprimées dans le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique sont injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transfecter ces cellules dans lesquelles ils doivent être exprimés *in vivo*.

L'invention concerne l'expression *in vivo* de séquences nucléotidiques et/ou de vecteurs tels que désignés dans le paragraphe précédent, c'est-à-dire des séquences correspondant à des gènes d'intérêt thérapeutique codant notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(i) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la

calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une
5 quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique
10 ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule. Il peut s'agir de fragments d'anticorps exprimés par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère ou patient porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps,

(ii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une
15 protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3,
20 SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; protéine inhibitrice de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4,
25 8,9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID
30 N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement

au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) soit au moins pour un ligand ou toute partie du ligand capable de se fixer sur au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit d'utiliser la thérapie génique de manière à diriger la réponse immune contre la protéine, le peptide ou la molécule d'intérêt cible, c'est-à-dire contre toute protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, leur(s) fragment(s) et/ou contre toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de l'expression et/ou du métabolisme desdites protéines d'intérêt, et/ou des ligands desdites protéines comme par exemple les récepteurs. Pour cela il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont des cellules appartenant au système immunitaire, soit des cellules de type lymphocytes (CD4/CD8), soit des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...).

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Les CPA comme les

macrophages, les cellules dendritiques, les microgliocytes, les astrocytes jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire. Elles sont les premiers composants cellulaires qui capturent l'antigène, l'apprête dans la cellule et expriment des molécules du CMHI et CMHII transmembranaires impliquées dans la présentation de l'immunogène aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺, elles produisent des protéines accessoires spécifiques qui participent à l'activation des cellules T (Debrick et al ;, 1991, J. Immunol 147 : 2846 ; Reis et al., 1993, J Ep Med 178 : 509 ; Kovacsovics-bankowski et al., 1993, PNAS 90 : 4942; Kovacsovics-bankowski et al., 1995 Science 267 : 243 ; Svensson et al., 1997, J Immunol 158 : 4229 ; Norbury et al ;, 1997, Eur J Immunol 27 : 280). Pour une vaccination, il peut être avantageux de disposer d'un système de thérapie génique qui peut cibler le transfert de gène dans de telles cellules APC, c'est-à-dire un gène qui code pour un polypeptide qui peut, après sa production intracellulaire et son « processing », être présenté aux cellules CD8⁺ et/ou CD4⁺ par les molécules des complexes CMHI et CMHII respectivement à la surface de ces cellules.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* tout ou partie d'un anticorps et/ou d'un ligand comme par exemple un récepteur, capable de réagir avec la protéine ou le peptide cible choisis parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. De telles cellules vont alors spécifiquement phagocyter ladite protéine ou ledit peptide, le « processer » de façon à ce que des fragments de ce peptide soient présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène.

La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour des anticorps capables de réagir avec des polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons par exemple les gènes codant pour les chaînes légère et lourde de

l'anticorps YTH 12.5 (anti-CD3) (Routledge et al. 1991, Eur J Immunol 21 : 2717-2725), de l'anti-CD3 selon Arakawa et al ; 1996, J. Biochem. 120 : 657-662. Les séquences d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier. Il est également possible à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en œuvre des banques d'ADNc (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec la séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire tel que la glycoprotéine rabique ou la gp160 (Polydefkis et al., 1990, J Exp Med 171 : 875-887). Ces techniques de biologie moléculaire ont été parfaitement bien décrites.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* des fragments immunogènes correspondant à au moins une protéines choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Pour cela, on peut choisir de faire exprimer par le vecteur soit le polypeptide complet soit de manière préféré des polypeptides sélectionnés pour réagir avec des ligands et/ou récepteurs spécifiques. Le peptide immunogène codé par le polynucléotide introduit dans la cellule du vertébré *in vivo* peut être produit et/ou sécrété, apprêté puis présenté à une cellule présentatrice de l'antigène (APC) dans le contexte des molécules du CMH. Les APC ainsi transférées *in vivo* induisent une réponse immune dirigée contre

l'immunogène exprimé *in vivo*. Les APC possèdent différents mécanismes pour capturer les antigènes : (a) la capture des antigènes par des récepteurs membranaires comme les récepteurs aux immunoglobulines (Fc) ou pour le complément disponibles à la surface des granulocytes, des monocytes ou macrophages permettant une délivrance efficace de l'antigène dans les compartiments intracellulaires après phagocytose médiée par les récepteurs. (b) l'entrée dans les APC par pinocytose en phase fluide, impliquant différents mécanismes : la micropinocytose c'est-à-dire la capture de petites vésicules (0.1µm) par les puits recouverts de clathrine et la macropinocytose c'est-à-dire la capture de plus grosses vésicules (avec une taille variant entre 0.5 µm et environ 6 µm) (Sallusto et al. 1995, J Exp Med 182 : 389-400). Tandis que la micropinocytose existe de façon constitutive dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à des types cellulaires, comme par exemple les macrophages, les cellules dendritiques, les astrocytes, les cellules épithéliales stimulées par des facteurs de croissance (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102 : 867-880). Dans cette invention, on entend par cellules capables de macropinocytose, les cellules qui peuvent réaliser les événements décrits ci-dessus et les cellules qui peuvent capturer des macromolécules de préférence entre 0.5 µm et environ 6 µm dans le cytoplasme.

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T helper de façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide correspondant aux protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, à des ligands desdites protéines, naturellement non exprimés par ces cellules, et capables d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide. Conformément à la présente invention, il est également possible de sélectionner une

séquence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps dirigé contre une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur
5 de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec
10 l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide naturellement non exprimé par ces cellules effectrices cytotoxiques ou lymphocytes T helper.

Par cellules effectrices cytotoxiques, on entend désigner les macrophages,
15 les astrocytes, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK) ainsi que leurs dérivés telles que par exemple les LAK (Versteeg 1992 Immunology today 13 : 244-247 ;Brittende et al 1996, Cancer 77 :1226-1243). Par 'lymphocytes T helper' on entend désigner notamment les CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune. Les polypeptides et
20 notamment les récepteurs exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur J Immunol 28 : 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene
25 therapy 5 : 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple NKAR, Nkp46, .. ; (Kawano et al., 1998 Immunology 95 :5690-5693 ; Pessino et al., 1998 J Exp Med188 :953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le récepteur Fc (Deo et al., 1997, Immunology Today 18 : 127-135).

30 De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et/ou vecteurs dans des cellules, en particulier des cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première

catégorie implique des technique physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie moléculaire et cellulaire avec lesquelles le gène est transféré avec un vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme et l'environnement, le risque de mutagenèse artéfactuelle par insertion dans la cellule hôte dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al. 1995, Human Gene Therapy 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 Immunity 1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation de méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (Haensler et Szoka 1993, Bioconjugate Chem 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature scientifique. Dans ce domaine des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait, il a été montré qu'une molécule d'acide nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989 (Felgner et al., Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules

anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les cellules. Différentes équipes ont développés de tels lipides cationiques : le DOTMA (Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), le DOGS ou TransfectamTM (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE
5 (Felgner et al., 1993 methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAPTM (McLachlan et al., 1995, Gene therapy 2 : 674-622) ou la LipofectamineTM, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autres groupes ont développés des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des
10 macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du polyéthylèneimine ou polypropylèneimine et les document US-A-5595897 et FR 2719316, l'utilisation des conjugués polylysine.

Etant donné que l'on souhaite obtenir *in vivo* une transformation ciblée
15 vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit pouvoir être lui-même « ciblé », comme décrit ci dessus.

Utilisation de cellules transformées *in vitro* ou *ex vivo* avec des vecteurs contenant un gène d'intérêt thérapeutique défini par rapport aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences
20 peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui
25 présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de maladies
30 dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins une cellule, notamment une cellule ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur

administration dans l'organisme d'un mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant *in vivo* pour :

5 (i) au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par
10 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID
15 N° 1 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et tout fragment

(ii) au moins un peptide défini à partir de la séquence primaire d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les
20 séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et
25 les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) au moins toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de la fixation et/ou de l'expression de ces protéines,

30 (iv) au moins un peptide issu de la séquence primaire d'une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de

protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les
5 séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et capable de se fixer sur au moins une glycoprotéine du CMHI,

(v) au moins tout anticorps et toute partie d'anticorps capables de se
10 fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID
15 N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à
20 traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Par « mammifère » on entend, de préférence, un mammifère humain. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont préférentiellement CMHII⁺ ou CMHII⁺-inductibles comme les lymphocytes, les monocytes, les
25 astrocytes, les oligodendrocytes.

L'invention concerne également les cellules modifiées et un procédé de
préparation d'une cellule telle que décrite ci dessus caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout
moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un
30 gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique contenant une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule ou un fragment de molécule *in vivo*, comme décrit

juste ci-dessus. Plus particulièrement, elle concerne des cellules procaryotes, des cellules de levure et des cellules animales, en particulier des cellules de mammifères transformées par au moins une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tel que décrit précédemment.

5 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules (cellules dendritiques, macrophages, astrocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+,) du patient ou allogéniques sont placées en contact d'une préparation purifiée du polypeptide cible, celui-ci étant internalisé, apprêté et présenté à la surface cellulaire associé aux molécules du CMHI et/ou CMHII et ainsi induire une réponse immune
10 spécifique contre le peptide. Les cellules « activées » sont ensuite administrées au patient chez lequel elles vont induire une réponse immune spécifique des antigènes (on utilise une voie naturelle de la réponse immune, mais on contrôle ce que la cellule présentatrice de l'antigène va présenter)

 Selon un mode de réalisation particulier, les cellules présentatrices
15 d'antigène (cellule dendritique, macrophage, astrocytes,..) sont modifiées *in vitro* pour exprimer les antigènes dans la cellule transformée qui vont s'associer aux molécules du CMHI et/ou CMHII et être présentées à la surface des cellules pour induire chez le patient chez lequel on administre la cellule modifiée une réaction immune parfaitement ciblée.

20 Toutes les approches vaccinales ne sont pas toujours satisfaisantes et conduisent par exemple à des réactions immunes limitées dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. De même la présentation incorrecte des antigènes par les glycoprotéines du système CMH à la surface des cellules, ne permet pas de développer chez le patient
25 traité une immunité anti-protéine d'intérêt convenable. Afin de pallier ces problèmes, certains auteurs ont proposé dans le cadre de tels procédés vaccinaux, de sélectionner les fragments minimaux antigéniques correspondant aux portions de peptide susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques, de les exprimer dans les cellules afin qu'ils s'associent aux molécules du CMHI et soient
30 présentés à la surface des cellules pour induire chez le patient traité une réaction immunitaire parfaitement ciblée (Toes et al. 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Plus particulièrement, il a été montré que des épitopes de très petites tailles (variant de 7 à

environ 13 acides aminés) qui sont exprimés à partir de minigènes introduits dans un virus de la vaccine, pouvaient induire une immunisation de type cellulaire. Il a par ailleurs été montré que plusieurs minigènes pouvaient être exprimés conjointement à partir d'un même vecteur (cette construction particulière est appelée « string of
5 beads »). Une telle construction présente l'avantage d'induire une réaction immune de type CTL synergique (Whitton et al., 1993 J. of Virology 67 : 348-352).

Protocole de mise en contact des cellules et du fragment antigénique :

La présentation des fragments antigéniques par les molécules CMHI repose sur un procédé intracellulaire identifié (voir Groettrup et al., 1996 Immunology
10 Today 17 : 429-435 pour une revue) au cours duquel des peptides antigéniques de très courtes tailles (environ 7-13 acides aminés) sont produits par dégradation d'un polypeptide plus complexe contre lequel la réaction immune finale sera dirigée. Ces courts peptides sont ensuite associés aux molécules du CMHI ou du CMHII pour former un complexe protéique qui est transporté à la surface cellulaire afin de présenter
15 lesdits peptides aux lymphocytes T cytotoxiques circulants ou aux lymphocytes T helper circulants, respectivement. Il convient en outre de noter que la spécificité des molécules CMH I ou CMH II vis-à-vis des peptides antigéniques varie en fonction des molécules CMH I ou CMH II (exemple pour le CMHI : HLA-A, HLA-B, ...) et de l'allèle (exemple pour le CMH I : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) considérés. Au sein
20 d'une même espèce animale, d'un individu à l'autre, il existe une grande variabilité des gènes codant pour les molécules du système CMH (à ce sujet, voir notamment George et al., 1995, Immunology Today 16 : 209-212).

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T CD4+, les
25 lymphocytes T CD8+, sont modifiées de manière à exprimer à leur surface des anticorps spécifiques du peptide ciblé. Le peptide est neutralisé par les anticorps exprimés à la surface des cellules. Ces cellules sont de préférence immunes, de préférence du patient, de préférence cytotoxiques, modifiées pour exprimer tout ou partie d'un anticorps spécifique du polypeptide cible.

30 Isolement de cellules mononucléées à partir de sang périphérique :

En 1968, Boyum décrit une technique rapide qui permet par centrifugation du sang sur gradient de densité, de séparer les cellules mononucléées

(lymphocytes et monocytes) avec un bon rendement (rendement théorique 50 %, c'est-à-dire 10^6 cellules /ml de sang). 50 ml de sang périphérique prélevés stérilement dans des tubes héparinés sont centrifugés 20 minutes à 150g à 20°C. Les cellules récupérées sont diluées dans deux volumes de sang périphérique initial de PBS stérile. 10 ml de
5 cette suspension sont déposés sur 3ml d'une solution de Ficoll-Hypaque (milieu de séparation des lymphocytes, Flow). Après centrifugation pendant 20 minutes à 400g et 20°C sans freinage de décélération, les cellules mononucléées sédimentent à l'interface PBS-Ficoll, en une couche dense, opalescente, alors que la quasi-totalité des globules rouges et des polynucléaires sédimentent au fond du tube. Les cellules
10 mononucléées sont récupérées et lavées en PBS stérile.

Internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

Traitement préalable des cellules présentatrices de l'antigène : les cellules présentatrices de l'antigène sont préalablement lavées avec un tampon PBS-BSA à 0.5% (p/v) puis énumérées puis elle sont préincubées en présence de différents
15 inhibiteurs de réduction trois fois en PBS-BSA 0.5% contenant de 10 μ M à 10 mM final de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) ou de NEM (N-éthylmaléimide). Les étapes ultérieures de fixation d'antigènes à la surface cellulaire ou d'internalisation d'antigènes se réalisent aussi en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs.

20 Protocole d'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

8.10^6 cellules sont internalisées en présence de quantité saturante de protéines radiomarquées à l'iode 125 (1 μ g) dans des micropuits dans 70 μ l. Après une heure d'incubation à 4°C sous agitation, les antigènes sont fixés à la surface des
25 cellules. La suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS-BSA et les culots cellulaires sont repris dans 70 μ l de tampon et incubées à 37°C pendant différentes périodes allant jusqu'à 2 heures. Cellules et surnageants sont séparés par centrifugation à 800g pendant 5 minutes 4°C. Pour des plus longues périodes d'incubation, l'étape préliminaire de préfixation des antigènes à la surface des cellules est supprimée. Les
30 cellules sont diluées dans un milieu RPMI-10% SVF en présence de 20 mM Hépès, à 10^6 cellules /ml. Les cellules sont incubées en présence d'un excès d'antigène pendant

différentes périodes à 37°C (1 µg de molécules /5.10⁷ cellules monocytes/macrophages ou /10⁸ cellules B-EBV).

Tous les agents thérapeutiques définis dans le cadre de la présente invention sont utilisés pour prévenir et/ou traiter une maladie dégénérative et/ou
5 neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, seuls ou en combinaison. Ils peuvent être utilisés également pour évaluer leur efficacité *in vitro* ou *in vivo*.

Administration chez l'homme des agents thérapeutiques:

Le matériel biologique selon l'invention peut être administré *in vivo*
10 notamment sous forme injectable. On peut également envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou
15 plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et/ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et/ou de la protéine et/ou peptide et/ou molécule et/ou cellule à transférer ou de l'organe/tissus cible.

20 Pour la mise en œuvre du traitement du mammifère mentionné dans la présente invention, il est possible de disposer de compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que précédemment décrit, avantageusement associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature (voir
25 par exemple Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed. 1980, Mack Publishing Co). Ce véhicule pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucre. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que de l'eau
30 stérile, libre d'agents pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

Figures :

La figure 1 représente la séquence en amino acides de la protéine GM2AP, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides GM2AP.

La figure 2 représente la séquence en amino acides de la protéine MRP14, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides MRP14.

La figure 3 représente la séquence en amino acides de la protéine Saposine B, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides Saposine B.

La figure 4 représente le dosage de la protéine MRP8 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 5 représente le dosage de la protéine MRP14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 6 représente le dosage de la protéine MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 7 représente les concentrations moyennes des protéines MRP8, MRP14, MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 8 représente le dosage de la protéine GM2AP (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS

signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 9 représente le dosage de la protéine Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 10 représente la co-détection des protéines Saposine B ($\mu\text{g/ml}$ - en ordonnée) et GM2AP (ng/ml - en abscisse) dans des échantillons d'urine de patients SEP, de témoins supposés sains et de patients atteints d'autres maladies neurologiques et la corrélation observée entre les taux des deux protéines.

La figure 11 représente : figure 11A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 11B le dosage de la protéine Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 12 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$ dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 13 : figure 13A, le dosage de la protéine GM2AP en ng/ml dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 13B le dosage de la protéine Saposine B en $\mu\text{g/ml}$ dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 14 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$ dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 15 représente la corrélation entre les concentrations de GM2AP en ng/ml (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 16 représente la corrélation entre les concentrations de Saposine B en µg/ml (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 17 représente la corrélation entre le produit des concentrations de GM2AP et Saposine B en $\text{ng}\times\mu\text{g}/\text{ml}^2$ (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 18 représente la corrélation entre les concentrations en GM2AP (ng/ml - en ordonnée gauche), les concentrations en Saposine B (µg/ml - ordonnée droite) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (abscisse). Deux droites de corrélation estimées sont représentées sur le graphe. Les lignes en gras sont relatives aux concentrations en saposine B ; les lignes en noir clair sont relatives aux concentrations en GM2AP.

Exemples :

Exemple 1 : Recueil et pool d'urines.

Des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus sains (SEP négatifs) n'ayant a priori aucune maladie neurologique ou auto-immune. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 20 litres d'urine a été constitué (pool SEP négatif). Parallèlement, des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus atteints de sclérose en plaques (SEP positifs) à différents stade de la maladie. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 80 litres d'urine a été constitué (pool SEP positif).

Exemple 2 : Purification des protéines urinaires.

Les pools d'urine SEP positif et SEP négatif, recueillis et testés selon l'exemple 1, ont été purifiés pour obtenir une concentration en protéines élevée et éliminer au maximum les protéines de haut poids moléculaire.

Précipitation : des précipitations au sulfate d'ammonium (Prolabo - réf. 21 333 365) ont été effectuées sur les pools d'urine SEP positif et SEP négatif. Le pourcentage de 60 % de sulfate d'ammonium saturé pour 40 % d'urine, soit 390 grammes de sulfate d'ammonium par litre d'urine a été utilisé. Chaque pool est réparti en fractions de 1,8 litres dans des flacons de 2 litres pour améliorer la précipitation. La précipitation a été effectuée durant 2 x 8 heures, à température ambiante, sous agitation douce. Après centrifugation des pools d'urine à 3 000 tpm pendant 10 min., à une température de 10°C, le culot obtenu est repris dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl_2 1 mM et de l'urée à 0,25 M. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3 000 tpm pendant 10 min. Le surnageant contient les protéines concentrées. Il est soit utilisé immédiatement pour l'étape suivante, soit congelé si l'étape suivante ne peut être effectuée en continu.

Chromatographie par échange d'ions : la solution contenant les protéines a ensuite été passée sur un gel DEAE fast Flow (commercialisé par PHARMACIA). Cette étape est effectuée à basse pression sur une colonne PHARMACIA remplie de gel. Les tampons sont amenés sur la colonne par une pompe péristaltique qui permet un débit régulier. Le tampon d'équilibration de la colonne est le tampon Tris 20 mM, pH 7. La fraction correspondant au surnageant de précipitation et contenant une quantité de sels trop élevée est dialysée contre ce tampon avant dépôt sur la colonne. Une élution par un gradient salin permet de récupérer les protéines. Le gradient d'élution est effectué par palier de NaCl 100, 200, 300, 500 mM dans le tampon d'équilibration de la colonne. Les fractions d'élution sont testées par le test MTT et ne seront conservées que les fractions positives, soit la fraction éluee à 200 mM NaCl. Ces fractions pourront être traitées immédiatement ou conservées à l'état lyophilisé.

Purification : Une chromatographie d'exclusion stérique basée sur la différence de taille et de forme des protéines à éluer a été utilisée. La fraction correspondant à l'élution 200 mM NaCl est déposée sur la colonne. Au cours de l'élution, les protéines de faible masse moléculaire sont retenues et donc éluées plus tardivement que les grosses molécules. Les purifications ont été effectuées sur HPLC

avec une colonne TosoHaas TSK Prep G 3000 SW, d'un diamètre de 21,5 mm et d'une longueur de 300 mm, la limite d'exclusion en masse moléculaire est de 500 000 daltons. Le tampon d'élution utilisé contient du phosphate 100 mM, du sulfate de sodium 100 mM, à pH 6,8. La séparation du mélange de protéines a été effectuée en 60 min. Seule la fraction correspondant à une masse de 15-20 000 daltons a été conservée. Cette fraction est dialysée dans un tampon Tris 20 mM contenant du CaCl_2 0,2 mM, pH 7,2, puis lyophilisée.

A chaque étape, seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape suivante. Un contrôle de l'activité toxique des protéines a été effectué à chaque étape, à l'aide du test MTT. Seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape de purification supplémentaire décrite dans l'exemple 3.

Exemple 3 : Purification supplémentaire des protéines urinaires par chromatographie phase inverse.

Des pools d'urine provenant de patients SEP (pool SEP positif) et de patients non SEP (pool SEP négatif), obtenus après purification selon l'exemple 2, ont été repris dans de l'eau distillée, puis dilués avec une solution 0,2% TFA/10% acétonitrile pour obtenir une concentration finale d'environ 130 à 140 µg/ml.

La séparation par HPLC phase inverse C8 a été effectuée sur une colonne Brownlee Aquapore (nom commercial) commercialisée par la société Perkin Elmer (caractéristiques de la colonne : 300 angstroms/7 µm/(100x4,6) mm). Deux colonnes distinctes ont été utilisées respectivement pour les pools positif et négatif. Les injections ont été réalisées par multi-injections de 250 µl. Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 5% à 15% de tampon B en 5 min., puis de 15% à 100% de tampon B en 95 min., à un débit de 0,5 ml/min. Les tampons de séparation A et B utilisés sont respectivement le tampon 0,1% TFA (Pierce n° 28904)/ eau MilliQ et le tampon 0,09% TFA/80% acétonitrile (Baker). La détection a été effectuée par mesure de l'absorbance UV à 205 et 280 nm. La collecte des fractions a été effectuée en fractions de 1,5 ml et de 0,5-1 ml dans la zone d'intérêt. Les fractions ont été congelées après la collecte dans de la carboglace.

Les fractions collectées ont ensuite été séchées en speed vac et reprises dans 100 µl de 0,1% TFA/30% acétonitrile. 20µl des fractions ont été transférés dans des eppendorfs de 500 µl, séchés et lavés à deux reprises avec 100 µl d'eau MilliQ, puis séchés de nouveau.

5 L'activité toxique des protéines contenues dans chaque fraction recueillie après élution a été déterminée à l'aide du test MTT. Seule la fraction 21 présentant une activité toxique significative a été retenue. Le numéro de cette fraction correspond à l'ordre de l'élution en fonction des conditions d'élution énoncée dans cet exemple.

10 Exemple 4: Analyse des protéines obtenues par séparation sur HPLC sur gel SDS-TRICINE.

Le pool de collecte de la fraction 21 obtenue par HPLC, comme décrit dans l'exemple 3, et provenant de 20 injections du pool SEP positif, a été déposé sur un gel SDS-TRICINE 16% précoulé de 10 puits et de 1 mm d'épaisseur (commercialisé
15 par la société Novex). Les conditions d'utilisation du gel correspondent à celles préconisées par le fournisseur. L'échantillon est repris dans 75 µl du tampon d'échantillon 1 fois concentré (SDS-TRICINE N° LC 1676, 1 ml deux fois concentré + 50µl de β-mercaptoéthanol (Pierce) dilué au 1/2 dans de l'eau) et 25µl de l'échantillon sont déposés sur le gel en trois fois. Le pool de collecte de la fraction 21 provenant de 6
20 injections du pool SEP négatif a été déposé sur le gel dans les mêmes conditions que celles décrites pour le pool SEP positif. La migration sur les deux gels a été effectuée en parallèle dans la même cuve de migration (XCELL II NOVEX (nom commercial)) à un voltage constant de 125 mV pendant 2 heures. La cuve est placée dans un bac contenant de la glace. Les gels ont été colorés directement après la migration par
25 coloration au zinc/imidazole (kit de coloration 161-0440 commercialisé par la société BIORAD) pour obtenir une coloration négative réversible. Les bandes de protéines sont translucides sur fond opaque.

Exemple 5 : Digestion à la trypsine des bandes de gel.

30 Toutes les bandes de protéines visualisées dans les dépôts de la fraction 21 ont été découpées et soumises à une protéolyse par la trypsine.

Les bandes de gels sont découpées au scalpel en tranches de 1 mm et transférées dans des tubes eppendorfs. Les eppendorfs sont soumis à un pic de centrifugation pour faire tomber les morceaux de gel et après centrifugation 100 µl de tampon de lavage (100 mM NH_4CO_3 /50% CH_3CN) sont ajoutés aux morceaux de gel.

5 Après 30 min. d'agitation à température ambiante, le surnageant est enlevé par fractions de 20 µl et l'étape de lavage est renouvelée deux fois. Les eppendorfs sont séchés pendant 5 min. en speed vac. 20 µg de trypsine (Modified sequenal grade PROMEGA V5111) sont repris dans 200 µl de tampon de digestion (5 mM TRIS, pH 8) et sont dissous pendant 30 min. à température ambiante, sous agitation intermittente

10 et 20 à 30 µl de trypsine resuspendue sont ajoutés aux morceaux de gel. Les eppendorfs sont centrifugés et conservés en chambre chaude à 28°C pendant une nuit. Après digestion les bandes de gel peuvent être utilisées immédiatement pour les mesures de masse ou congelées pour usage ultérieur.

15 Exemple 6 : Digestion chimique au CNBR des bandes de gel.

Dans l'éventualité d'une protéine résistante aux clivages enzymatiques, en particulier à l'action de la trypsine comme décrit dans l'exemple 5, les bandes entre 16kD et 20kD ont été traitées avec du CNBR. Les bandes de gel, déjà utilisées pour les digestions avec la trypsine, sont séchées 5 à 10 min. en speed vac.

20 Une solution de CNBR (FLUKA) à 200 mg/ml a été préparée dans 70 % acide formique (BAKER). 20 µl de cette solution ont été utilisées pour réhydrater les morceaux de gel. La réaction s'est faite pendant 20 h à température ambiante et à l'obscurité. Les peptides sont extraits 3 fois 30 min. avec 100 µl de 0.1 % TFA / 60% Acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et concentrées à 20 µl. Ces

25 échantillons sont dilués 5 fois dans 0,1 % TFA/eau. Les conditions de séparation sont celles décrites pour les peptides de la digestion avec la trypsine.

Exemple 7 : Analyse par spectrométrie MALDI-TOF.

30 30 µl de tampon d'extraction (2 % TFA/50 % acétonitrile) sont ajoutés aux échantillons. Les eppendorfs à analyser sont soumis à une centrifugation de 5 min., puis à une sonication de 5 min. et finalement à une centrifugation de 1 min.

Sur un disque en acier inoxydable, 14 dépôts de 0,5 µl de matrice (acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique à saturation dans de l'acétone) sont réalisés. Une fine couche microcristalline uniforme est obtenue. 0,5 µl d'une solution de 2 % TFA/eau sont déposés sur cette sous-couche sur les 14 dépôts, puis 0,5 µl d'échantillon à analyser sont ajoutés. Dans cette goutte ainsi formée, 0,5 µl d'une solution à saturation d'acide d'acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique dans 50 % acétonitrile/eau sont ajoutés. Après un séchage à température ambiante pendant 30 min., les dépôts cristallins sont lavés avec 2 µl d'eau qui sont immédiatement évacués par un souffle d'air. Tous les spectres sont obtenus sur un spectromètre de masse BRUKER BIFLEX (marque de commerce) équipé d'un réflectron. Les mesures (90 à 120 tirs laser sur l'ensemble du dépôt) sont accumulées pour obtenir un spectre de masse qui soit le plus représentatif de l'ensemble des peptides présents dans le sandwich matrice-échantillon. Pour chaque dépôt, une calibration avec les peptides de l'autolyse de la trypsine a été faite afin de pouvoir utiliser une précision de mesure inférieure à 100 ppm.

Les recherches dans les banques de données ont été exécutées dans MS-FIT PROTEINPROSPECTOR (<http://prospector.ucsf.edu>). Les paramètres communs, utilisés dans ces recherches, sont (1) base de données : NCBIInr, (2) une tolérance de 100-50 ppm, (3) les cystéines ne sont pas modifiées, (4) les méthionines peuvent être oxydées, (5) gamme de poids moléculaire : 1000-100000 Da, (6) jusqu'à 3 sites de coupure peuvent être ignorés.

Exemple 8 : Séquençage N-terminal des peptides de digestion.

(i) Extraction et séparation par HPLC des peptides de digestion.

Après les mesures de masse sur la totalité de la digestion, le reste des peptides est extrait en 3 fois 30 min. dans un bain de sonication avec 0,1 % TFA/60 % acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et séchées jusqu'à 20 µl en speed vac. Après dilution dans 80 µl de tampon A (0,1 % TFA/eau), les extractions des bandes de gel, digérées avec de la trypsine, sont injectées sur une colonne C18/MZ-Vydac/(125x1,6)mm/5 µm. L'élution des peptides se fait à un débit de 150 µl/min. et dans un gradient allant de 5 % de tampon B (0,09 % TFA/80 % acétonitrile) à 40 % de tampon B en 40 min., puis de 40 % de tampon B à 100 % de tampon B en 10 min. La

détection est faite par mesure de l'absorbance UV à 205 nm. La collecte des pics est effectuée dans des tubes eppendorf de 500 µl. Les fractions sont conservées sur la glace et pour la bande de 18-20 kD du pool 21 SEP positif analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

5 (ii) Séquençage N-terminal.

Les fractions ne correspondant qu'à un seul pic de masse ont été analysées par dégradation d'Edman sur un séquenceur (Modèle 477A PERKIN ELMER/Applied Biosystems). Les conditions de séquençage sont celles décrites par le constructeur. Une micro cartouche a été utilisée pour le dépôt des échantillons et les PTH-AminoAcid
10 sont identifiés avec un système HPLC online (Modèle 120A PERKIN ELMER/Applied Biosystems).

Le dépôt de la fraction à séquencer s'est fait en plusieurs dépôts de 15 µl avec des séchages intermédiaires. Le tube ayant contenu le peptide est lavé avec 15 µl d'acide formique 85 % (BAKER). Les séquences d'acides aminés correspondent
15 toujours aux masses mesurées. Les peptides, dont les masses ne correspondent pas à la protéine principale identifiée, ont été séquencés en priorité. De cette manière, il a été possible d'identifier jusqu'à trois protéines dans une bande de gel.

Exemple 9 : Résultats et discussion.

20 Après HPLC inverse du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif, l'activité toxique de chaque fraction d'élution a été déterminée en utilisant le test MTT. Seule la fraction 21 du pool SEP positif présente une activité toxique *in vitro*. La fraction 21 du pool témoin SEP négatif ne présente aucune activité toxique. L'activité toxique de la fraction 21 du pool SEP positif a été confirmée *in vitro* par FACS, comme
25 décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 sur des cellules astrocytaires murines.

Le contenu protéique de la fraction 21 du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif a été observé après séparation sur gel SDS-TRICINE 16% et coloration du gel au zinc/imidazole. Des protéines de poids moléculaires apparents élevés ont été trouvées dans les deux fractions. Par contre cinq bandes différentes et de
30 poids moléculaires apparents faibles ne sont visibles que dans la fraction 21 du pool SEP positif (bandes 8, 14, 18 et 20 kD). A chaque bande correspond au moins une protéine et des variants desdites protéines qui ont un poids moléculaire apparent proche

de celui de la protéine native. Ces séquences variantes présentent un pourcentage d'homologie ou d'identité avec les séquences natives d'au moins 70%, de préférence d'au moins 80% et avantageusement d'au moins 98 %.

Les protéines d'intérêt de la fraction 21 du pool SEP positif ont ensuite été
5 analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie dans les banques de données. Les résultats montrent la présence de cinq bandes de protéines migrant entre 22 et 5 kD dans la fraction 21 du pool SEP positif et des variants desdites protéines.

Ces protéines sont le fragment C-terminal du Perlecan, qui commence à
10 l'acide aminé 3464 et se termine à l'acide aminé 3707 de la séquence protéique complète, identifiée dans l'identificateur de séquences SEQ ID N° 2, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 identifié en SEQ ID N° 8, la calgranuline B identifiée en SEQ ID N° 17 et la saposine B représentée en SEQ ID N°
15 24. Comme décrit ci dessus des homologues ou variants desdites protéines ont également été identifiés par séquençage. Ces séquences protéiques homologues ou variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines. A titre d'exemple, la SEQ ID N° 9 présente 99 % d'homologie ou d'identité avec la SEQ ID N° 8 du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et le fragment
20 de SEQ ID N° 9 qui commence à l'acide aminé 34 et se termine à l'acide aminé 202 présente 98,88 % d'homologie ou d'identité avec le fragment correspondant de la protéine native identifiée en SEQ ID N° 8.

Exemple 10 : Mise en évidence des protéines dans un échantillon urinaire.

25 Des échantillons d'urine provenant d'un individu SEP négatif et d'un patient SEP positif ont été prélevés. Ces échantillons d'urine ont été purifiés selon le protocole décrit précédemment. Les fractions d'élution finales 21 ont été analysées séparément par spectrométrie de masse. Le profil de masse de chaque fraction correspondant à chaque échantillon d'urine a été comparé au profil de masse obtenu
30 pour les protéines identifiées dans les exemples précédents. Les résultats montrent que pour l'échantillon d'urine provenant du patient SEP positif les masses correspondent aux molécules (i) fragment C-terminal du Perlecan, (ii) précurseur de la protéine

activatrice du ganglioside GM2, (iii) calgranuline B et (iv) saposine B identifiées précédemment. Par contre aucune de ces masses n'a été identifiée dans le profil de masse obtenu après analyse de l'échantillon d'urine provenant de l'individu SEP négatif. Le procédé décrit est utilisable comme essai de diagnostic.

5

Exemple 11 : Essai en Western Blot.

Des Western Blot ont été réalisés sur différentes fractions d'urine brute ou purifiée comme décrit dans l'exemple 2. Des échantillons d'urine provenant d'individus sains et de patients atteints de sclérose en plaques sont testés en parallèle.

10 Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse permettant de séparer les différentes protéines en fonction de leur masse moléculaire sous l'action d'un champ électrique. Les Western Blot sont réalisés après transfert des protéines du gel sur une membrane. Pour révéler les protéines transférées, la membrane est saturée en tampon de saturation, puis incubée avec un anticorps directement marqué à la phosphatase

15 alcaline. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-calgranuline (anticorps monoclonal de souris, clone CF 145 sous-type IgG 2b commercialisé par la société Valbiotech : référence MAS 696p lot PC96G696). Le substrat de l'enzyme est le dichlorure de 3,3'-(1,1'-biphényl)4,4'diazonium et 2-naphtalényle phosphate de sodium (commercialisé sous la dénomination β Naphtyl acid phosphate Sigma réf. N7375 et δ dianisine

20 Tetrazotized D3502) est ajouté pour la révélation des bandes et la visualisation des protéines liées à l'anticorps. Une molécule de masse moléculaire apparente d'environ 14 000 est révélée dans les urines purifiées de patients atteints de SEP, avec un signal relativement intense. Cette protéine correspond à la calgranuline B (masse moléculaire apparente : 14 kD). Par contre, aucun signal n'est observé à partir d'urine d'individus

25 sains. Cette observation confirme la présence de cette protéine spécifiquement dans les urines de patients atteints de SEP et la mise en œuvre d'un procédé de détection utilisant un anticorps reconnaissant la protéine.

Exemple 12 : Production d'anticorps monoclonaux.

30 La production d'anticorps monoclonaux par ascite impose une compatibilité du système H-2 entre l'hybridome et la souris productrice. 20 souris femelles Balb/c, âgées de 6 semaines, subissent une injection de 0.5ml de Pristane (2-6-

10-14 acide tétraméthylpentadécane) dans leur cavité péritonéale, pour la production d'ascite (Porter et al., 1972). Une semaine à 10 jours plus tard, 5.10^6 à 10.10^6 hybridomes dilués dans 0.5ml de tampon stérile NaCl 0,145M, Na_2HPO_4 10 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM à pH 7.4. sont injectés par voie intrapéritonéale. L'ascite apparaît une à deux semaines plus tard. Les liquides d'ascites présents dans la cavité péritonéale sont alors recueillis avec une seringue après incision du péritoine. Le liquide recueilli est centrifugé à 3000g pendant 15 minutes à température ambiante, filtré sur gaze pour éliminer le gras, puis tamponné en ajoutant 1/20^{ème} de son volume de tris-HCl 1M à pH 8.0. Cette méthode permet d'obtenir des quantités d'anticorps 10 fois supérieures à celles obtenues par culture d'hybridomes.

Les immunoglobulines présentes dans le liquide d'ascite sont relarguées par les sels (sulfate d'ammonium ou sulfate de sodium). Le liquide d'ascite est précipité par le sulfate d'ammonium 40%. Après 20 minutes au froid la solution est centrifugée 15 minutes 8000g à 4°C. Le précipité est lavé et resuspendu à froid dans une solution de sulfate d'ammonium 40% puis de nouveau centrifugé. Le nouveau précipité enrichi en IgG est remis en solution dans du tampon PBS et dialysé la nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM pH 7,4. Parallèlement une colonne d'agarose-Protéine A (ou protéine G) (commercialisée sous forme lyophilisée, Pierce) est lavée extensivement avec le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4. La solution enrichie en IgG est déposée sur la colonne puis la colonne est lavée. Les IgG retenues par la colonne sont éluées à pH acide (glycine 200 mM pH 2.8). Les fractions éluées sont neutralisées avec un volume de Tris-Base 1M pH 10.5. Le contenu en immunoglobulines de chaque fraction recueillie est quantifiée par lecture d'absorbance à 280 nm (ϵ 1%,1cm = 14.0 Prahl et Porter 1968). Les fractions riches sont poolées. Le degré de purification des IgGs poolées est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les IgGs purifiées sont dialysées une nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4, filtrées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C. leur concentration finale est déterminée par lecture de l'absorbance à 280 nm ou par dosage micro-BCA. Les peptides immunogènes référencés SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 65 ont été utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, selon le protocole décrit ci dessus. Mais, il est à la portée de l'homme du

métier de définir d'autres protocoles pour la production d'anticorps monoclonaux, par exemple à partir des techniques décrites par Köhler et Milstein et par Galfre G. *et al.* précédemment cités ou des techniques dérivées de celles ci.

Production de protéines recombinantes et d'anticorps polyclonaux et
5 monoclonaux.

Protéines recombinantes :

Les protéines recombinantes GM2AP (SEQ ID NO :73) et Saposine B (SEQ ID NO :74) utilisées pour réaliser la gamme étalon de cette étude ont été produites en système procaryote et purifiées à partir des clones de ces deux protéines
10 obtenus dans notre laboratoire en utilisant les méthodes et protocoles bien connus de l'homme de l'art.

Anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B :

Les anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B utilisés pour réaliser l'étude ont été soit produits dans notre laboratoire ou donnés généreusement.
15 Des anticorps polyclonaux anti-Saposine B et anti-GM2AP (Li et al, Glycoconjugate, 1984) ont été utilisés pour l'étude (cf les exemples ci-dessous) : ils sont dénommés SAP84 et GM2AP84.

Des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien
20 connus de l'homme de l'art : 50 µg de protéine GM2AP ou Saposine B procaryote achetée ont été injectés à des lapins aux jours J0, J28 et J56 ; deux injections de rappel ont été réalisées une fois par mois pendant deux mois consécutifs. Les deux anticorps polyclonaux anti-GM2AP et deux anticorps polyclonaux anti-Saposine B ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par
25 Western blot et par Elisa.

Des anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP ou Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 75 µg de peptides GM2AP ou Saposine B définis, produits et couplés à KLH dans notre laboratoire ont été injectés aux jours J0, J28 et
30 J56 ; plusieurs boosts ont été réalisés une fois par mois pendant 5 mois consécutifs avec injection de 75 µg à chaque fois. Quatre anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP, quatre anticorps polyclonaux anti-peptides Saposine B et quatre anticorps

polyclonaux de lapins anti-peptides MRP14 ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par Western blot et par Elisa. La séquence des peptides GM2AP, Saposine B et MRP14 choisis sont décrites dans les figures de 1 à 3.

5 Il a été obtenu :

- un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 15 acides aminés de GM2AP : 189-190 ; un anticorps anti-peptide de 18 acides aminés de GM2AP : 191-192 (cf. Figure 1),

- un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 19 acides aminés de MRP14 : 193 ; un anticorps anti-peptide de 17 acides aminés de MRP14 : 195-196 (cf. Figure 2),

- un anticorps anti-mélange de trois peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 74-75 ; un autre anticorps anti-mélange de 3 peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 72-73 (cf. Figure 3).

15 Des anticorps monoclonaux anti-fraction native ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art. La « fraction native » correspond à la fraction d'élution cytotoxique obtenue à partir du pool des 80 litres d'urine de patients SEP et après purification. C'est la dernière fraction d'élution qui contient les trois protéines GM2AP, Saposine B, 20 MRP14. 30 µg de cette fraction de purification ont été injectés à trois souris aux jours J0, J14, J28 et le prélèvement a été effectué à J38. Après « screening » et fusion cellulaire, protocoles connus de l'homme de l'art pour l'établissement d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux, les hybridomes ont été ré-injectés à la souris et le liquide d'ascite a été récupéré 10 jours après. Les anticorps ont été purifiés sur colonne 25 sépharose-Protéine A et la spécificité vis-à-vis de la fraction utilisée pour l'immunisation a été vérifiée par Western blot et par Elisa. Ainsi quatre anticorps monoclonaux ont été obtenus : 19C1A7, 3D3F9, 18C8C5 et 7D12A8.

Exemple 13 : Dosage des protéines MRP14 dans les urines par technique 30 ELISA.

Les protéines MRP14, MRP8 et l'hétérocomplexe MRP8/14 ont été dosés dans des urines humaines en utilisant (i) soit une technique de dosage Elisa selon le

procédé connu de l'homme de l'art et en utilisant les anticorps anti-MRP décrits dans les exemples précédents ; (ii) soit le kit 'MRP Enzyme Immunoassay' commercialisé par BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland, en utilisant les anticorps du kit, le protocole étant réalisé suivant la notice du kit..

5 Détection de MRP14 et MRP8/14 dans des urines.

Les dosages a été réalisés à partir de 17 urines d'individus issus de la population active (TS), de 27 urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP et de 7 urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN).

- La figure 4 illustre les taux de MRP8 dosés dans ces urines : alors que la
10 concentration en MRP8 est quasiment nulle dans les urines AMN, il n'y a pas vraiment de différence de distribution entre les urines TS et SEP. Notons cependant que les différences observées sont quasiment négligeables car les concentrations dosées sont extrêmement faibles.

- La figure 5 illustre les taux de MRP14 dosés dans les mêmes urines :
15 alors qu'il n'y a pas vraiment de différences de distribution des concentrations entre les urines TS et AMN, les concentrations sont plus élevées dans certaines urines SEP.

- La figure 6 illustre les taux d'hétérodimère MRP8/14 dosés dans les mêmes urines : alors qu'il n'y a pas vraiment de différence entre les concentrations des urines TS et AMN, on observe des plus fortes concentrations dans certaines urines
20 SEP, correspondant peut-être à une sous population de patients SEP caractérisée par une activité de la maladie. MRRP8/14 dosé dans les urines est un marqueur de l'activité de la maladie SEP caractérisée par un pic d'inflammation).

- La figure 7 récapitulative confirme qu'il n'y a pas de différence significative de concentration en MRP8 et en MRP14 entre les urines TS, AMN et
25 SEP, alors qu'une faible différence de concentration en MRP8/14 est observée entre ces urines, cette concentration étant plus élevée en moyenne dans les urines SEP et étant un marqueur de l'activité de la maladie (pic d'inflammation).

Exemple 14 : Protocoles ELISA utilisés pour le dosage des protéines
30 GM2AP et Saposine B.

Les protéines GM2AP ou Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ? en

suivant le protocole Elisa décrit par Gardas et al. (Glycoconjugate Journal 1, 37-42, 1984). Les principales étapes sont brièvement décrites ci-dessous :

A chaque étape, les puits d'une microplaque de 96 puits sont remplis avec 200 µl de la solution désignée. Les puits sont d'abord « coatés » avec une solution de GM2AP (protéine recombinante procaryote) diluée à 50 ng/ml dans un tampon carbonate-bicarbonate, pH 9,6. Après incubation une nuit à 4°C, la solution est éliminée et les puits sont lavés quatre fois avec du tampon PBS pH 7,4 contenant du Tween-20 0.05% (PBS-Tween). Les microplaques ainsi coatées sont stockées à 4°C pendant environ 2 semaines.

Les échantillons d'urine à trois dilutions différentes (20x, 40x et 80x ou d'autres dilutions appropriées) sont incubés avec une dilution appropriée de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GM2AP ou anti-Saposine B pendant une nuit à 4°C. Une série de dilutions standard d'une protéine recombinante allant de 2,0 à 62,5 ng/ml est utilisée pour réaliser la gamme étalon et sont traitée de la même façon. Toutes les dilutions sont faites en tampon PBS-Tween contenant 1 mg/ml d'ovalbumine. Ainsi, 0,2 ml de chaque solution incubée est ajoutée dans des puits « coatés » en duplicat et les plaques sont laissées pendant 2 heures à température ambiante. Les puits sont alors lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis encore avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxidase et diluée environ 1200 fois. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, les puits sont lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis e nouveau avec le réactif de coloration. Le réactif de coloration consiste en 100 mg d'acide 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline) sulfonique et 10µl de 30% de peroxide d'hydrogène pendant une heure à température ambiante et le degré de coloration de chaque micropuits est estimé par lecture d'absorbance à 405 nm.

Une courbe standard est construite en mettant en abscisse la concentration de GM2AP de la gamme étalon ou de Saposine B avec une échelle logarithmique et en ordonné le pourcentage d'absorbance avec une échelle linéaire. Le pourcentage d'absorbance de l'échantillon est le rapport d'absorbance entre l'échantillon d'urine et le contrôle qui contient seulement l'antisérum, sans l'antigène soluble.

Une solution de protéine recombinante GM2AP produite en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits

d'une solution à 0,5 µg/ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. L'anticorps polyclonal anti-GM2AP produit dans le laboratoire (lapin 79) a été purifié et dilué en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. Cette solution est diluée au 1/8000^{ème}. La solution est utilisée pour réaliser
5 une gamme étalon avec 8 points de gamme couvrant les concentrations de 0 à 500 ng/ml. Une préincubation est réalisée pendant une nuit à température ambiante entre 100 µl d'anticorps et 100 µl d'échantillon d'urine à doser ou de solution protéine recombinante GM2AP ou Saposine B servant pour la gamme étalon. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation sont ajoutés par puits, puis
10 incubés pendant deux heures à température ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase et dilués au 1/5000 sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après de nouveaux lavages de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à
15 température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou de Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Une solution de protéine recombinante GM2AP ou Saposine B produite
20 en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits d'une solution à 1,5 µg /ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. Les anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP produits dans le laboratoire (lapin 190 et lapin 191) purifiés sont utilisés seuls ou en
25 mélange dilués au 1/1000 pour chacun en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10% . La gamme étalon est réalisée en utilisant de la protéine recombinante procaryote GM2AP ou Saposine B diluée de façon à couvrir la gamme de concentration 0 à 1500 ng/ml avec 8 points. 100 µl d'anticorps (un anticorps ou les deux ensemble) sont pré-incubés en présence de 100µl d'échantillon d'urine à tester ou
30 de solution GM2AP ou Saposine B recombinante, pendant une nuit à température ambiante. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation est ajouté par puits puis incubés pendant deux heures à température

ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase, dilués au 1/5000, sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après lavage de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Exemple 15 : Dosage des protéines GM2AP dans les urines.

La protéine GM2AP a été dosée dans les urines de 22 patients atteints de sclérose en plaques (SEP), 5 patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et 9 individus choisis parmi la population active et recueillis pendant une visite médicale (Healthy), en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP. Les patients SEP sélectionnés pour cette étude sont des patients tout azimut, c'est-à-dire avec différents stades et profils de la maladie, et différents traitements, etc...

Les résultats du dosage sont rapportés dans la figure 8. Alors que seulement 0/5 urines OND et 2/9 urines dites 'Healthy' présentent une concentration en GM2AP supérieure à 200 ng/ml, 10/22 (soit 45%) présentent une concentration supérieure à 200 ng/ml.

Ces résultats indiquent que si la protéine GM2AP est présente en très faible concentration (<400 ng/ml) dans les urines d'individus de la population active, elle est présente en plus forte concentration dans les urines de patients SEP. Cependant 12 urines SEP présentent également des taux faibles de GM2AP. Parmi ces 12 patients, 10 sont en traitement. Les fortes concentrations urinaires de GM2AP semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencé par tout traitement en cours. Notons que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de GM2AP (ces deux cas ont été inclus volontairement dans l'étude, car ils présentaient tous deux une activité gliotoxique dans leur urines contrairement aux autres individus de cette même catégories). Il est impossible de savoir s'il s'agit d'individus sains, ou atteints d'une pathologie, ou des individus

atteints d'une sclérose en plaques car les échantillons des individus dits « Healthy » ont été prélevés de manière anonyme, sans connaissance du dossier clinique.

Des concentrations urinaires plus élevées de GM2AP sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de GM2AP peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP bénigne en début d'évolution, etc

Les valeurs absolues des concentrations GM2AP détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

Exemple 16 : Dosage des protéines Saposine B dans les urines.

La protéine Saposine B a été détectée dans les mêmes échantillons d'urines que ceux utilisés pour l'étude de la détection de GM2AP. Les dosages ont été réalisés en parallèle avec ceux du GM2AP, dans une même étude, en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-Saposine B.

Les résultats du dosage Saposine B sont reportés dans la Figure 9. 0/5 urines OND et 2/9 urines Healthy présentent une concentration en Saposine B supérieure à 2 µg/ml, alors que 6/22 (soit 27%) présentent une concentration supérieure à 2 µg /ml.

Ces résultats indiquent que la protéine Saposine B est présente dans chaque urine (population dite saine ou population dite malade) à des concentrations non négligeables, c'est-à-dire < 2µg /ml. Ces résultats de dosage sont compatibles avec ceux décrits dans la bibliographie. Cependant même si la Saposine B est présente dans chaque urine, elle semble être présente en plus forte concentration dans certaines urines SEP. Cette augmentation de concentration de saposine B dans les urines Sep est peut-être masquée par la concentration basale de cette protéine à l'état ordinaire. Ainsi les fortes concentrations urinaires de Saposine B semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la

maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencée par tout traitement en cours. La Saposine B dosée seule semble être cependant un marqueur un peu moins discriminant d'une forme ou d'une activité de la maladie que le GM2AP. Notons encore un fois que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de Saposine B et que ce sont les deux même individus qui présentaient aussi une forte concentration en GM2AP dans leurs urines.

En conclusion, des concentrations urinaires plus élevées de Saposine B sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de Saposine B peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP benigne en début d'évolution, etc Mais d'une façon générale, les fortes concentrations de Saposine B seules semblent être des marqueurs moins discriminants que les fortes concentrations de GM2AP seules.

Les valeurs absolues des concentrations Saposine B détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

Exemple 17 : Co-dosage des protéines GM2AP et Saposine B dans les urines.

La Figure 10 reporte les concentrations de GM2AP dosée dans les échantillons d'urine décrites dans la Figure 5 par rapport à la concentration de Saposine B dosée dans ces mêmes échantillons et décrite dans la Figure 6. Dans ce graphe sont reportés les échantillons SEP (losanges foncés) et les échantillons OND et 'Healthy' (losanges blancs).

Sur ce graphe, il apparaît clairement que :

- plus la concentration en GM2AP est élevée dans les urines, plus la concentration en Saposine B est élevée. (Nous avons montré que ce n'est pas un cas général avec d'autres protéines et que cela ne traduit pas une perturbation rénale, avec le dosage de la créatinine en parallèle pour chacun des échantillons testés.) ;

- les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B sont caractéristiques des échantillons SEP (à l'exception des deux urines de la population active, mentionnées ci-dessus). Ces concentrations élevées conjointes de GM2AP et Saposine B sont des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une fenêtre de la maladie (quadrant à droite et en haut du graphe).

En conclusion, cette analyse confirme que des concentrations urinaires élevées de GM2AP (>400 ng /ml) et de Saposine B (>2 µg /ml) sont co-détectées dans les urines de patients SEP et peuvent représenter des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peuvent être influencée par tout traitement en cours. Il est avantageux de doser les deux protéines en parallèle dans chaque échantillons, et de considérer les deux concentrations.

Dosage de GM2AP et Saposine B dans l'urine de deux patients en cinétique.

Patient SEP n°1 - Forme Rémittente Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash de corticoïdes puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique). La figure 11 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 12 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash de corticoïdes jusqu'à 90 jours.

Patient SEP n°2 - Forme Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash d'Endoxan puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique et à J60, des signes d'aggravation de la maladie ont été observés). La figure 13 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 14 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations

élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash d'Endoxan (ou encore appelé cyclophosphamide) jusqu'à 23 jours et semblent augmenter pour devenir élevées à J60, montrant ainsi une parfaite corrélation avec l'évolution des signes cliniques.

Ces résultats confirment que :

- des concentrations fortes de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de la pathologies SEP, et en particulier la co-détection des fortes concentrations des deux protéines conjointement (traduit par le produit des deux concentrations) ;

- les fortes concentrations de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de l'activité de la maladie (ici pendant la poussée) ou sont des marqueurs influencés par les traitements immuno-suppresseurs comme les corticoïdes ou l'Endoxan qui abaissent les concentrations.

Cet exemple illustre le fait que ces marqueurs peuvent être utilisés entre autres :

- pour réaliser un suivi thérapeutique d'un patient et évaluer le bénéfice thérapeutique d'un traitement pour un patient donné ; ou

- de prédire une aggravation de la maladie, prédire un pic d'activité, etc...

- de décider une (re)prise thérapeutique anticipée sur les signes cliniques

Exemple 18 : Corrélation entre la détection des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans les urines et la gliotoxicité mesurée dans ces urines.

Afin de vérifier une corrélation entre la présence de ces protéines seules ou en combinaison dans les urines et la gliotoxicité des urines, ont été dosées en parallèle les concentrations en protéine d'intérêt et la gliotoxicité d'un échantillonnage d'urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), de patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et d'individus issus de la population active dit « Healthy ». Parmi les patients SEP, on note des patients avec différentes formes et stades de la maladie, sous traitement ou non, à différentes activités de la maladie.

Les protéines MRP, GM2AP et Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en suivant les protocoles Elisa décrits ci-dessus. Les dosages analysés dans

cet exemples sont ceux décrits dans les exemples précédents. Chaque échantillon d'urine analysé en Elisa a été analysé par le test MTT pour mesurer la gliotoxicité de chaque échantillon. La gliotoxicité est exprimée en pourcentage de cellules mortes (estimé par colorimétrie en utilisant les sels de tetrazolium) d'une lignée cellulaire astrocytaire murine (CLTT1.1) après 48 heures d'incubation en présence d'urine centrifugée.

La figure 15 représente la concentration en GM2AP en fonction de la gliotoxicité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites « Healthy » (losanges noirs) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que toutes les urines témoins (OND et Healthy) ont des taux en GM2AP faibles (<400 ng/ml) et une gliotoxicité faibles (<15%), à l'exception d'une urine témoin Healthy (déjà commentée dans l'exemple 15) pour laquelle on observe une forte concentration en GM2AP et une gliotoxicité.

Les urines SEP sont réparties en trois sous-populations :

- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et faible gliotoxicité (<15%),
- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et gliotoxicité (>15%), soit essentiellement 3 urines,
- urines à forte concentration en GM2AP (>400 ng /ml) et forte gliotoxicité (>15%).

Ces trois sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques,

Cependant on peut noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP présentent également une forte gliotoxicité.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en GM2AP et gliotoxicité (toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP sont gliotoxiques (10/10), et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 3 urines/12 SEP). Ceci traduit l'implication de la protéine GM2AP dans le mécanisme de gliotoxicité, seule ou

en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée, mais reconnaissable par un anticorps anti-GM2AP. De plus la co-détection d'une forte concentration en GM2AP dans les urines et d'une forte gliotoxité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP.

5 La figure 16 représente la concentration en Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples .15 et 16. On observe que plus les urines
10 sont riches en Saposine B, plus elles sont gliotoxiques. Il y a une corrélation assez nette entre concentration de Saposine B et gliotoxité des urines.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en Saposine B et gliotoxité. Ceci traduit l'implication de la protéine Saposine
15 B dans le mécanisme de gliotoxité, seule ou en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par l'anticorps anti-saposine B utilisé pour le dosage.

La figure 17 représente le produit des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

20 Les 22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) des exemples 15 et 16 ont été reportés dans la figure 17. La gliotoxité de ces urines est analysée en fonction du produit des concentrations en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire en fonction de la co-détection des deux protéines dans les urines. On observe très nettement une corrélation entre le
25 produit des deux concentrations GM2AP et Saposine B et la gliotoxité, bien plus importante qu'en ne considérant qu'une seule protéine. On observe que 5/5 des urines OND ont un produit de concentration GM2AP et Saposine B faible et une gliotoxité faible ; 8/9 urines « Healthy » ont un produit de concentration GM2AP et SaposineB faible et/ou une gliotoxité faible. Par contre, on distingue essentiellement trois sous-
30 populations d'urines SEP :

- urines à faible concentration en GM2AP.Saposine B et faible gliotoxité (<15%),

- urines à forte concentration en GM2AP. Saposine B et forte gliotoxicité (>15%).

Ces deux sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques, Cependant il est très important de noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire ayant conjointement une forte concentration en GM2AP et Saposine B, présentent également une forte gliotoxicité. Les deux sous populations de patients SEP sont d'autant plus marquées et nettes que l'on considère conjointement les trois marqueurs : gliotoxicité, concentration élevée en GM2AP et concentration élevée en Saposine B. Ceci est confirmé à la figure 18.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée de GM2AP et Saposine B et Gliotoxicité. Toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP et Saposine B sont gliotoxiques, et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP et Saposine B ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 2 urines/22 SEP. Ceci traduit l'implication des deux protéines GM2AP et Saposine conjointement ou en combinaison dans le mécanisme de gliotoxicité, sous leur forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par les anticorps anti-GM2AP et anti-saposine B utilisés pour le dosage. De plus la co-détection d'une forte concentration urinaire en GM2AP et Saposine B et d'une forte gliotoxicité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie ?), par rapport à une autre sous population. Ces trois marqueurs considérés conjointement permettent de discriminer entre deux sous populations de patients SEP.

Evolution de la gliotoxicité et des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de l'évolution de la maladie de deux patients après et pendant traitement.

La corrélation entre gliotoxicité, forte concentration en GM2AP ET Saposine dans les urines et pathologie SEP a également été confirmée en mesurant ces trois paramètres dans l'urine de deux patients au cours de l'évolution de leur maladie.

Patient n°1 : SEP forme rémittente-progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash de corticoïde à J1. Après le flash, il a montré une amélioration clinique jusqu'à J90 - (cf. figures 11,12),

Patient n°2 : SEP forme progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash d'Endoxan (encore appelé cyclophosphamide) à J1. A J60, il présente de nouveaux des signes cliniques d'aggravation de sa maladie - (cf. figures 13,14).

5 Pour les deux patients, il a été montré :

- une corrélation entre la gliotoxité urinaire et l'évolution clinique de la maladie (lorsque les signes cliniques sont sévères, la gliotoxité est élevée ; lorsque les signes cliniques diminuent suite au traitement, la gliotoxité diminue et devient stationnaire ; lorsque les signes d'aggravation apparaissent après le traitement, la
10 gliotoxité semble augmenter de nouveau),

- une corrélation entre le taux de gliotoxité dans les urines de patients et les concentrations de GM2AP et Saposine B, et

- une corrélation entre les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B et l'évolution clinique de la maladie.

15 En conclusion : le dosage des protéines GM2AP ET Saposine B dans les urines est un bon marqueur discriminatif d'une sous population de la SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie). Les protéines GM2AP et/ou Saposine B sont impliquées dans le mécanisme de gliotoxité, seules ou en combinaison, sous leur forme naturelle ou sous une forme reconnaissable par les anticorps polyclonaux utilisés
20 pour leur dosage. Comme les protéines GM2AP et Saposine sont co-détectées en forte concentration dans les urines gliotoxiques, il est possible que ces deux protéines agissent en combinaison pour induire la gliotoxité.

Exemple 19 : Analyse immunohistochimique de l'expression des protéines
25 GM2A, SAPB, MRP14 et MRP8 dans un système de culture producteur de gliotoxine in vitro (cultures de monocytes), ainsi que dans le tissu cérébral normal et pathologique de SEP et de témoins.

Protocole : Des cultures de monocytes d'un patient atteint de SEP et d'un témoin sain ont été réalisées en parallèle, selon le protocole présent décrit brièvement.
30 A partir de sang périphérique de ces deux volontaires prélevé sur ACD, les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolés sur Ficoll en utilisant la technique connue de l'homme de l'art. Les cellules récupérés (au niveau de l'anneau) sont lavées

deux fois en milieu RPMI. Les cellules sont alors énumérées sur Kova-slide et sont
ensemencées en flacon primaire de 25 cm² ou sur lame Labteck (8 cupules) (en
permanox) en milieu RPMI supplémenté avec 15% de sérum AB humain à J0. Les
cellules sont cultivées sur des lames alvéolées de type « Labtek » afin de disposer d'un
5 support direct pour l'analyse des monocytes qui adhèrent au support et se différencient
ultérieurement en macrophages. Pour les lames, 2.10⁶ cellules sont ainsiensemencées à
raison de 0,25 10⁶ cellules/puits. Pour les flacons, 4.10⁶ cellules sontensemencées à
raison de 0,25 10⁶ cellules/puits. A J1, les cellules en suspension sont récupérées et les
puits des Labteck ou les flacons sont lavés deux fois en RPMI (au préalable chauffé à
10 37°C) avant de rajouter du milieu RPMI supplémenté avec 5% de sérum AB humain.
A J1, J3, J6, J9, J12 ou 14, J15 le milieu de culture est changé ; les surnageants sont
prélevés et les cellules fixées sur lames en utilisant les techniques connues de l'homme
de l'art. A chaque changement de milieu, au moins deux lames ont été fixées en
paraformaldéhyde et conservées pour l'analyse immunohistochimique.

15 Composition du milieu : RPMI (500 ml) avec 15ml de glutamate 200
mM, 5 ml de pyruvate de sodium 100 µM, 5 ml d'acides aminés non essentiels (100x),
des antibiotiques pénicilline et streptomycine 100 000 U /µl et des anticorps anti-
interferon humains à 100 U/µl.

Résultats : Quatre cultures de monocytes *in vitro* ont été ainsi étudiées en
20 cinétique : deux cultures de monocytes issus de sang d'individus contrôles et deux
cultures de monocytes issus de patients SEP. A différents temps de la culture (J0, J1,
J3, J6, J9, J12,), les surnageants correspondants ont été également récupérés. Une
fois la cinétique complétée, les lames correspondant aux différents jours de cultures ont
été incubées en présence d'anticorps polyclonaux anti-GM2A, SAP-B, MRP-8 et
25 MRP14. La gliotoxicité de chaque surnageant ainsi récupéré a été estimé par test MTT.
La concentration en protéine GM2AP, MRP14 et Saposine B a également été
déterminée dans chaque surnageant par protocole Elisa comme décrit dans les
exemples 13 et 14.

Les résultats d'immunofluorescence sur cellules fixées sont résumés ci-
30 dessous ; on peut noter :

- une absence d'expression de MRP8 à tous les stades des 2 cultures

- une expression nette de MRP-14 dans la période entre J9 et J15, retrouvée dans les deux cultures, quoique plus forte dans la culture SEP. Cette expression semble corréluer une étape de différenciation macrophagique.

- une très faible expression (faible intensité et faible nombre de cellules) est observée en début de culture dans la culture témoin et correspond vraisemblablement à la présence physiologique de GM2A dans les lysosomes macrophagiques.

- Dans la culture SEP, une expression beaucoup plus nette de GM2A (plus forte intensité et nombre de cellules plus important) est observée, avec un marquage cytoplasmique relativement homogène entre J3 et J6, disparaît à J9 et est à nouveau notée à J14-J15 avec un marquage intense et localisé à la périphérie cytoplasmique, dessinant le contour interne de la membrane plasmique. Ces observations ne sont pas retrouvées dans l'ensemble des lames témoins.

L'analyse avec le anticorps anti-SAP-B n'a pas permis d'obtenir un marquage immuno-histochimique interprétable.

Dans les cultures de monocytes SEP déjà effectuées, 3/3 ont présenté un pic de gliotoxicité à J9 et 2/3 un pic plus faible à J6. Aucun pic n'étant détecté dans les cultures de monocytes de 2/2 témoins non-SEP analysés en parallèle. De même, le dosage des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans le surnageant des cultures cellulaires au cours de la cinétique a montré que les protéines SapB et GM2AP sont détectées par Elisa dans les surnageants des monocytes SEP et non dans ceux des monocytes témoins, aux jours J6 et surtout J9 de la culture ; les protéines ne sont pas détectées au-delà de cette cinétique. Notons que les anticorps utilisés pour le dosage peuvent reconnaître les formes physiologiques des protéines, mais également des formes complexées et/ou modifiées.

On constate donc que la période J6-J9 pendant laquelle on observe une gliotoxicité la plus importante dans le surnageant, est couverte par la période J3-J15 pendant laquelle on observe une production moins différenciée du témoin négatif de GM2A dans les cellules avec des fluctuations quantitatives et qualitatives de son expression cellulaire (quantité d'expression et localisation cellulaire).

Exemple 20: Technique d'immunohistologie sur coupes de cerveaux en paraffine.

Les coupes histologique préparées en paraffine sont déparaffinées en xylène et alcool avant de subir un prétraitement qui a pour but de démasquer les antigènes ; ce prétraitement peut correspondre à (i) deux fois 5 minutes sous micro-
onde (750W) en présence d'un tampon citrate de sodium, acide citrique, (ii) un traitement à l'acide par incubation 15 minutes dans une solution d'acide périodique 1% ou par incubation 5 minutes dans une solution d'acide formique 99%. Les peroxydases endogènes sont ensuite bloquées par incubation des lames 30 minutes en eau oxygénée 1% puis lavage extensif en eau pendant 15 minutes. Le bruit de fond est bloqué en incubant les lames 30 minutes en présence de PBS Triton 0.03%, 10% sérum Donkey (pour les anticorps polyclonaux) ou 10% sérum Goat (pour les anticorps monoclonaux). Un marquage avec l'anticorps primaire est réalisé en appliquant 100 à 200 µl de solution d'anticorps primaire par lame (0.5 à 5 µg /ml selon le titre) dans du PBS Triton 0.03% puis en incubant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 3 fois en PBS-Triton pendant 10 minutes. Un marquage anticorps secondaire est réalisé en utilisant des anticorps biotinylés capables de se fixer spécifiquement aux anticorps primaires, par exemples des anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris dilués dans du PBS-Triton 0.03%. les lames sont lavées et incubées dans une solution pendant 2 heures (2 µl complexe streptavidine-biotine-peroxydes, 1600 µl PBS-Triton 0.03%). Les lames sont de nouveau lavées avant d'être révélées à l'abri de la lumière dans le tampon A puis rincées à l'eau avant observation microscopique. Tampon A pour 5 lames : 25 ml Tris 0.05M pH 7.6, 2.5 ml Imidazole 1M, 15 ml eau stérile, 2 ml DAB 5 mg/ml, 5 ml Nickel d'ammonium 10%, 30 µl H₂O₂ 1%.

Les mêmes anticorps ont été utilisés pour une étude immunohistochimique, selon la technique décrite brièvement ci-dessous, sur lames paraffinées obtenues par coupe au microtome de cerveaux prélevés post-mortem de SEP et de témoins décédés de pathologies non-neurologiques.

Les résultats de l'analyse sont résumés ci-dessous :

Il n'y a pas de marquage des cerveaux « non-SEP » et SEP dans la substance grise et la substance blanche « normale (non lésée) avec les différents anticorps anti- MRP8, MRP14, GM2A. Une réactivité non spécifique n'a pas permis

d'interpréter les résultats avec l'anticorps anti-saposine B dans cette application immunohistochimique.

Par contre on note, dans les zones de plaques des cerveaux SEP :

- une réactivité anti-MRP14 dans les cellules macrophagiques et microgliales, ayant une distribution relativement homogène sur toute l'étendue des zones de démyélinisation (plaques),
- une plus faible (moins fréquente) réactivité anti-MRP8 liée essentiellement aux infiltrats lymphoïdes périvasculaires
- une nette réactivité anti-GM2A dans les macrophages et microgliocytes des zones de plaques, avec une densité particulière dans les zones constituant le « mur glial » en limite périphérique de plaque. Un marquage de quelques astrocytes a aussi été retrouvé dans les zones de démyélinisation.

Ces différentes observations montrent qu'il existe une hyperexpression particulière des protéines MRP-14 et GM2A dans les cultures de monocytes de SEP produisant une activité gliotoxique dans leur surnageant, ainsi que dans les zones définissant des plaques de démyélinisation dans les cerveaux de SEP. Elles témoignent donc de la réalité de la coïncidence entre leur co-expression anormale, la production d'activité gliotoxique et les lésions de démyélinisation.

De plus, leur production anormale dans le contexte de la SEP, dans les cellules macrophagiques sanguines ainsi que dans celles du cerveau, indique qu'il est fondé de réaliser leur dosage dans les fluides biologiques pour corréler leur quantité avec l'activité lésionnelle et inflammatoire de la SEP.

Exemple 21 : Mesure de l'activité des cellules T par prolifération des cellules T (Sredni et al., 1981).

Les cellules T sont lavées deux fois en milieu de culture pour éliminer toute trace d'IL2 présente dans le milieu initial de culture. Des lymphocytes B (EBV-LCL) ou des monocytes/macrophages pris comme cellules présentatrices de l'antigène, sont irradiées à 10000 rads, lavées deux fois avec du milieu de culture (RPMI). 2.10^4 cellules T (2.10^5 cellules /ml) et 2.10^4 cellules B autologues irradiées (2.10^5 cellules /ml) sont incubées ensemble en présence d'une gamme de concentration croissante de

l'antigène sous un volume final de 200 µl dans des micropuits. Après 48 heures de culture à 37°C, 1 µCi de 3H- thymidine dans 50 µl de milieu RPMI est ajouté dans chaque puits. Les cellules T, seules à se diviser, incorporent la thymidine tritiée dans l'ADN. Après 18 heures de culture, les cellules de chaque micropuits sont récoltées sur des pastilles de laine de verre par aspiration. Après lyse osmotique des cellules, la radioactivité incorporée dans l'ADN est absorbée sur les pastilles (cell Harvester 530, Inotech). Chaque pastille séchée est placée dans un tube plastique qui contient 2 ml de scintillant ; la radioactivité adsorbée sur chacune des pastilles est quantifiée dans un compteur bêta à scintillation liquide (LKB Rackbeta 1217). Les résultats sont exprimés comme moyenne arithmétique de cpm/culture ('coups par minute').

Exemple 22 : Protocole de détection de l'association entre les peptides et les molécules d'histocompatibilité (approche APC transformées avec un peptide se fixant au CMH I).

1) Matériel :

Les sources de molécules d'histocompatibilité sont actuellement de deux types principaux : les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174 (Salter and Cresswell Embo J 1986, 5: 943-949). Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter de peptides exogènes.

Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent être également utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1.5 M et de la soude 12.5 mM (pH 11.7) pendant 1 heure à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PDLO, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0.05% Tween 20, 2 mM EDTA, 0.1% NP40 et 6 mM CHAPS, en présence de 2 µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic et al., Eur J Immunol 1995 25 : 1638-1642).

Les peptides testés ont en général 8 à 10 résidus, parfois 11 ou 12. Ils ont été synthétisés par Néosystems (Strasbourg), ou par Chiron mimotopes (Victoria, Australie). Ils sont utilisés à des concentrations variant de 100 μ M à 0.1 nM.

2) Protocole de l'assemblage (Connan et al., Eur J Immunol 1994, 24 : 777 ; Couillin et al. Eur J Immunol 1995, 25 : 728-732).

Des aliquotes de 8.105 cellules dans un volume de 64 μ l, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100 μ M iodoacétamide, 2 μ g /ml aprotinine, 10 μ M leupeptine, 10 μ M pepstatine et 10 μ g/ml inhibiteur de trypsine). La lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 tours /minute à 4°C, le surnageant est additionné de 140 μ l de PBS contenant 0.05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg /ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 heures à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc,Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (10 μ g /ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation de peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg /ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps qui permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité est dirigé contre la B2m. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-552, Sigma) et est incubé à 2 μ g /ml pendant une heure à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 minutes à 20-25°C avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat le 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (M-8883, Sigma) à 100 μ M dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl₂ 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre.

3) Stabilité des complexes HLA/peptides :

La stabilité des complexes précités a été étudiée car elle conditionne la bonne présentation de l'antigène et l'induction de la réponse T. A cet effet, on a utilisé soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule T2. Avec le HLA purifié, on a éliminé les

peptides endogènes (comme décrit en 2)) puis on l'a mis en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C, pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque de 96 puits (comme décrit en 2) avec l'anticorps anti-HLA se fait pendant une heure à 37°C. La révélation est effectuée de
5 manière classique. Avec le lysat de la cellule T2, toutes les incubations sont également faites à 37°C, après ajout de tous les inhibiteurs de protéases.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

2. Utilisation d'au moins deux polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à une séquence peptidique choisie parmi SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine

plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

3. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

4. Utilisation selon la revendication 3, de cinq polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide comprend une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

7. Utilisation d'un fragment polypeptidique défini dans la revendication 1 ou dans la revendication 3 pour la préparation d'un peptide immunogène, caractérisé en ce que ledit peptide comprend tout ou partie d'au moins une des séquences référencée SEQ ID N° 58 à 65.

5 8. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment
10 d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ
15 ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, les fragments complémentaires desdits fragments et les
20 fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit
25 fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies
30 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

11. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un
5 fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N°
10 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

12. Utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes pour obtenir une
15 composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en
20 plaques.

14. Procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une
25 protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N°
30 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit ligand est un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

16. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide comprend une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

22. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment comprenant au moins une mutation par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

23. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

24. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

25. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

26. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce qu'il consiste en une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

27. Utilisation d'au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 22 à 26 pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

28. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que le polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 est utilisé

en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

29. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que
5 l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et le ligand.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'on met en
10 contact l'échantillon biologique avec un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 et avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

31. Procédé selon la revendication 29 ou 30, caractérisé en ce que ledit
15 ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

32. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 dans un échantillon biologique caractérisé
20 en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que ledit ligand est
25 anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

34. Procédé selon la revendication 30 ou 31, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec un ligand tel que défini dans l'une quelconque
30 des revendications 31 et 33 et au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, puis on détecte la

formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides.

35. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce que le ligand est
5 un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

36. Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26.

10

37. Utilisation d'un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est le
15 fragment nucléotidique défini dans la revendication 35, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 8 à 11, et les fragments complémentaires desdits fragments.

38. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 35, caractérisé
20 en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 36 caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

25 40. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide
30 biologique, on analyse par spectrométrie de masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

41. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 8, SEQ ID N°9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 8 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, et de préférence SEQ ID Nos :8, 9, 17 et 24.

42. Utilisation, selon la revendication 41, dans laquelle les séquences peptidiques sont comprennent les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et de la saposine B.

43. Utilisation, selon l'une quelconque des revendications 41 ou 42, qui est associée à l'utilisation d'une détection d'une activité gliotoxique.

44. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on dose au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour détecter ou prévenir un état pathologique, le dosage permettant d'obtenir une valeur de concentration qui est comparée à une valeur seuil représentative d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

45. Procédé, selon la revendication 44, dans lequel la valeur seuil est obtenu par un test ELISA pour un échantillon d'urine, cette valeur étant de :

- 400 ng/ml pour le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, pour l'anticorps GM2AP84, et
- 2 µg/ml pour la saposine B, pour l'anticorps SAPB84.

5 46. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on détecte au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour prévenir un état pathologique, la détection s'effectuant dans des cellules ou dans les surnageants desdites cellules d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

10

47. Procédé, selon la revendication 46, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules monocytes ou macrophages ou dans les surnageants de ces cellules issues d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

15

48. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules ou dans les surnageants de ces cellules en culture, après un délai compris entre 6 et 12 jours de culture, préférentiellement après 9 jours.

20

49. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules, in vivo ou ex vivo, préférentiellement monocytes ou macrophages, dans des cerveaux de patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

25

50. Utilisation ou procédé, selon l'une quelconque des revendications 41 à 49, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune est la sclérose en plaques ou bien une forme (progressive, rémittente, rémittente-progressive) ou phase d'activité (poussées) de cette maladie.

30

51. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite

protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

52. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine.

53. Utilisation selon la revendication 51 ou 52, caractérisée en ce que le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

54. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester
5 l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ
10 ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui
15 présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine
20 plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

55. Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-
25 immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 54.

56. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative
30 et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la

séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

57. Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 56.

58. Utilisation selon la revendication 54 ou 56, caractérisée en ce que ledit fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

59. Utilisation selon la revendication 58, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

60. Utilisation selon la revendication 59, caractérisée en ce que les polypeptides sont choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

61. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

62. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

63. Utilisation selon la revendication 61 ou 62, caractérisée en ce que la séquence nucléique est choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

64. Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Lapins anti GM2

➤ **Ganglioside GM2 activator**

2 peptides de 13,15 acides aminés lapins 189 190
1 peptide de 18 acides aminés lapin 191 et 192

MQSLMQAPLL IALGLLLATP AQAHLKKPSQ
LSSFSDNCD EGKDPVIRS LTLEDPPIVV
PGNVTLSVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV
AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP
TGEPCEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS
EFVVPDLELP SWLTTGNYRI ESLSSSGKR
LGCIKIASLKG I

GM2A

ATG CAG TCC CTG ATG CAG GCT CCC CTC CTG ATC GGC CTG GGC TTG CTT CTC GCG ACC CCT GCG CAA GCC CAC CTG
M Q S L M Q A P L L I A L G L L A T T C T T C T C G C G A T P A Q A H L
CCA TCC CAG CTC AGT AGC TTT TCC TGG GAT AAC TGT GAT GAA GGG AAG GAC CCT GCG GTG ATC AGA AGC CTG ACT
P S Q L S S F S W D N C T G T G A T G A A G G G A G K D P A V I R S L T
CCT GAC CCC ATC GTC GTT CCT GGA AAT GTG ACC CTC AGT GTC GGC AGC ACC AGT GTC CCC CTG AGT TCT CCT
P D P I V V P G N V T L S V V G S T S V P L S S
GTG GAT TTA GTT TTG GAG AAG CAG GTG GCT GGC CTC TGG ATC AAG ATC CCA TGC ACA CAC TAC ATT GGC AGC TGT
V D L V L E K E V A G L W I K I P C T D Y I G S
GAA CAC TTC TGT GAT CTG CTT GAC ATG TTA ATT CCT ACT GGG GAG CCC TGC CCA GAG CCC CTG CGT ACC TAT GGG
E H F C D V L D M L I P T I G E P C P E L R Y G
TCC CAC TGT CCC TTC AAA GAA ACC TAC TCA CTG CCC AAG AGC GAA TTC GTT CCT GAC CTG GAG CTG CCC
F C H C P F K E G T Y S L P K S E V V P D L E L P
CTC ACC ACC GGG AAC TAC CGC ATA GAG AGC GTC CTG AGC AGC AGT GGG CGT CTG GGC TGC ATC AAG ATC GCT
L T T G N Y R I E S V L S S S G K R L G C I K I A
CTA AAG GGC ATA
L K G I *

FIG. 1

2 peptides de 13, 19 acides aminés lapin 193
1 peptide de 17 acides aminés lapin 195-196

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE
HIMEDDLDTN ADKQLSFEFF IMLMARLTWA
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP

ATG	ACT	TGC	AAA	TCG	CAG	CTG	GAA	CGC	AAC	ATC	ATC	ATC	ACC	TTC	CAC	CAA	TAC	TCT	GTG	AAG	CTG	GGG	CAC	CCA
M	T	C	K	M	S	Q	L	E	R	N	I	I	T	F	H	Q	Y	S	V	K	L	G	H	
CTG	CAC	CAG	GGG	GAA	TTC	AAA	CTG	CTG	CGA	AAA	GAT	CTG	CAA	NAT	TTT	CTC	AAG	GAG	AAT	AAG	AAG	CTG	ATA	
L	N	Q	G	E	F	K	E	L	V	R	K	D	L	Q	N	T	C	K	E	N	K	E	N	
M	G	D	L	D	T	N	A	D	K	Q	L	S	F	E	F	I	M	L	M	A	R	L	T	
ATG	CAC	GAG	GCT	GAG	GGC	CCT	GGC	CAC	CAT	AAG	CCA	GGC	CTC	GGG	GAG	GGC	ACC	CCC						
H	H	E	G	D	E	G	P	G	H	H	K	P	G	L	G	E	G	T						

FIG. 2

Lapin anti Saposine

3 peptides de 12,15, 15 acides aminés lapin 74-75
3 peptides de 12,15,15 acides aminés lapin 72-73

GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE
HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ
MMMHHMQDQQP KEICALVGFC DEV

Sap
ATG GGG GAC GTT TGC CAG GAC TGC ATT CAG ATG GTG ACT GAC ATC CAG ACT GCT GTA CGG ACC AAC TCC ACC TTT GTC CAG
GCC M G D V C Q D C I Q M V T D I Q T A V R T N S T F V Q
A
TTG GTG GAA CAT GTC AAG GAG GAG TGT GAC CGC CTG GGC CCT GGC ATG GCC GAC ATA TGC AAG AAC TAT ATC AGC CAG TAT
TCT L V E H V K E E C D R L G P G M A D I C K N Y I S Q Y
S
GAA ATT GCT ATC CAG ATG ATG CAC ATG CAA CCC AAG GAG ATC TGT GCG CTG GTT GGG TTC TGT GAT GAG TGA
E I A I Q M M M H M Q P K E I C A L V G F C D E *

FIG. 3

Dosage MRP 8

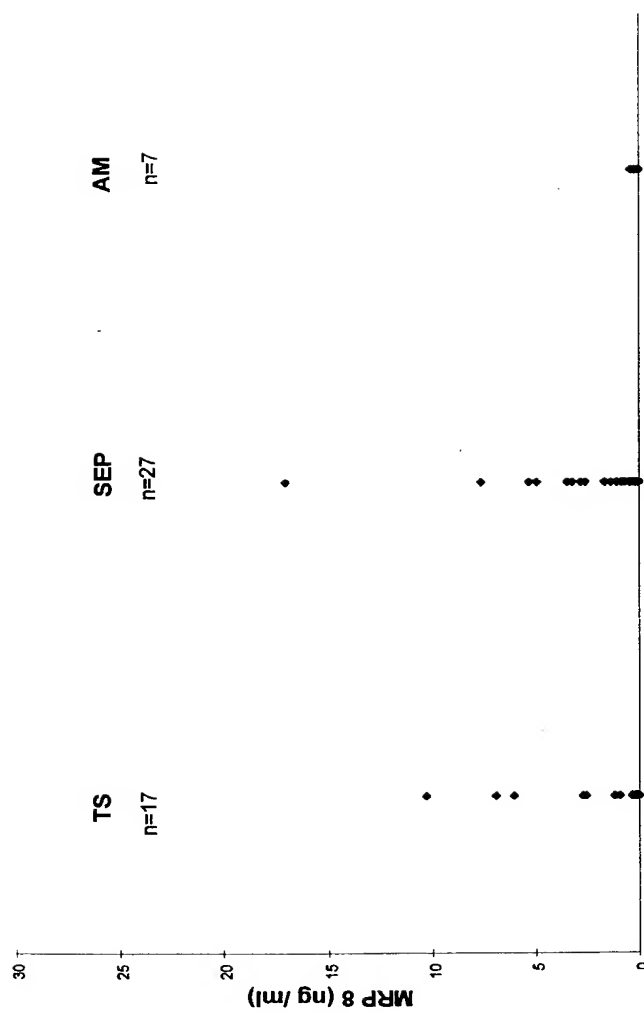


FIG. 4

5/18

Dosage MRP14

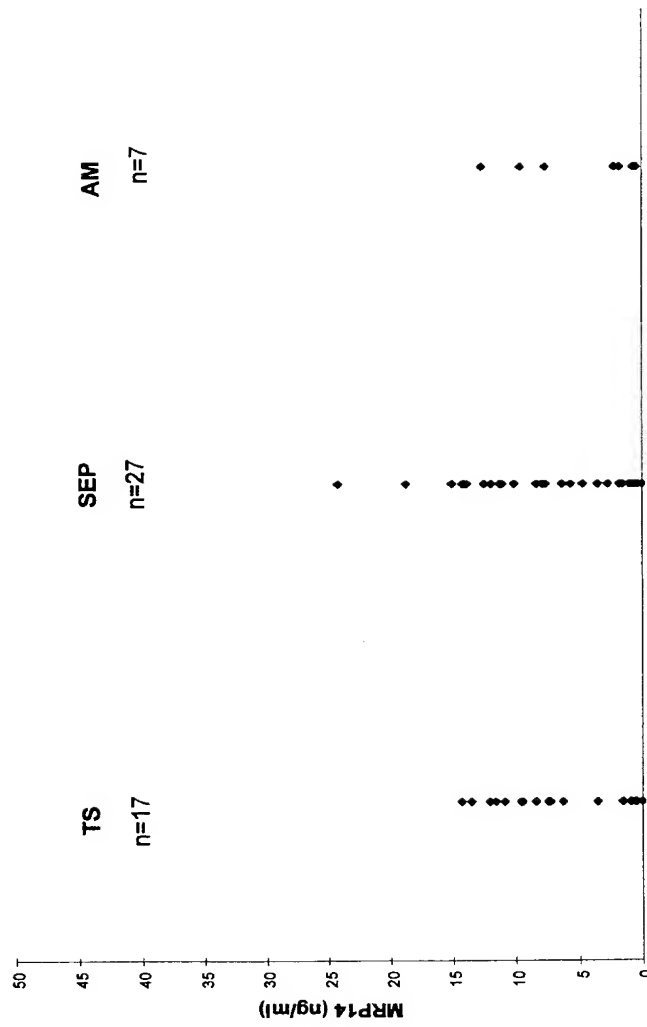


FIG. 5

6/18

Dosage MRP8/14

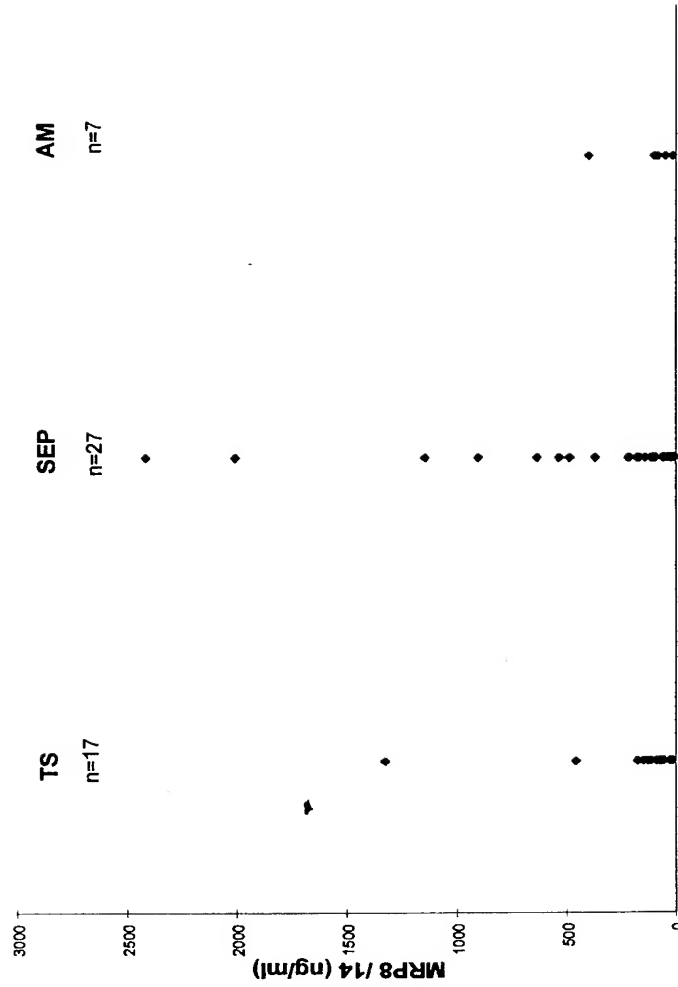


FIG. 6

Taux urinaire moyen par catégorie de population

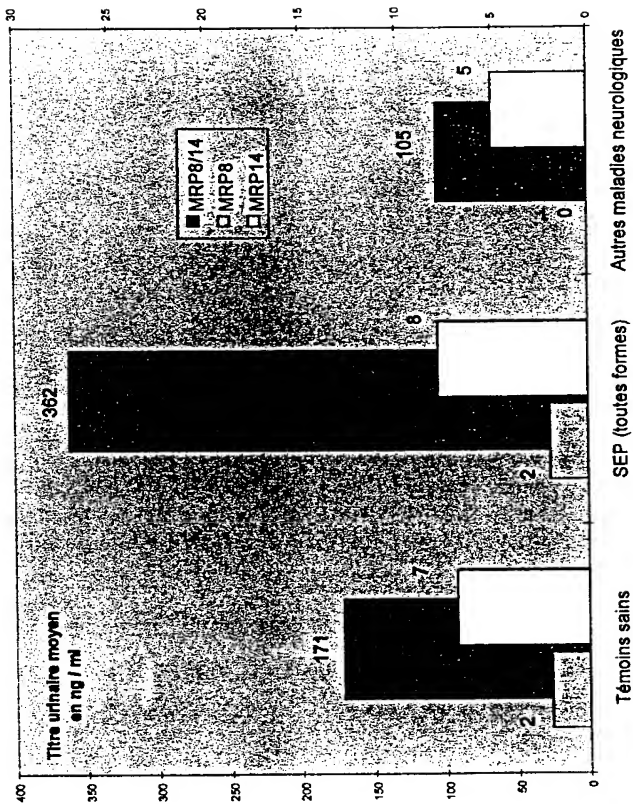


FIG. 7

8/18

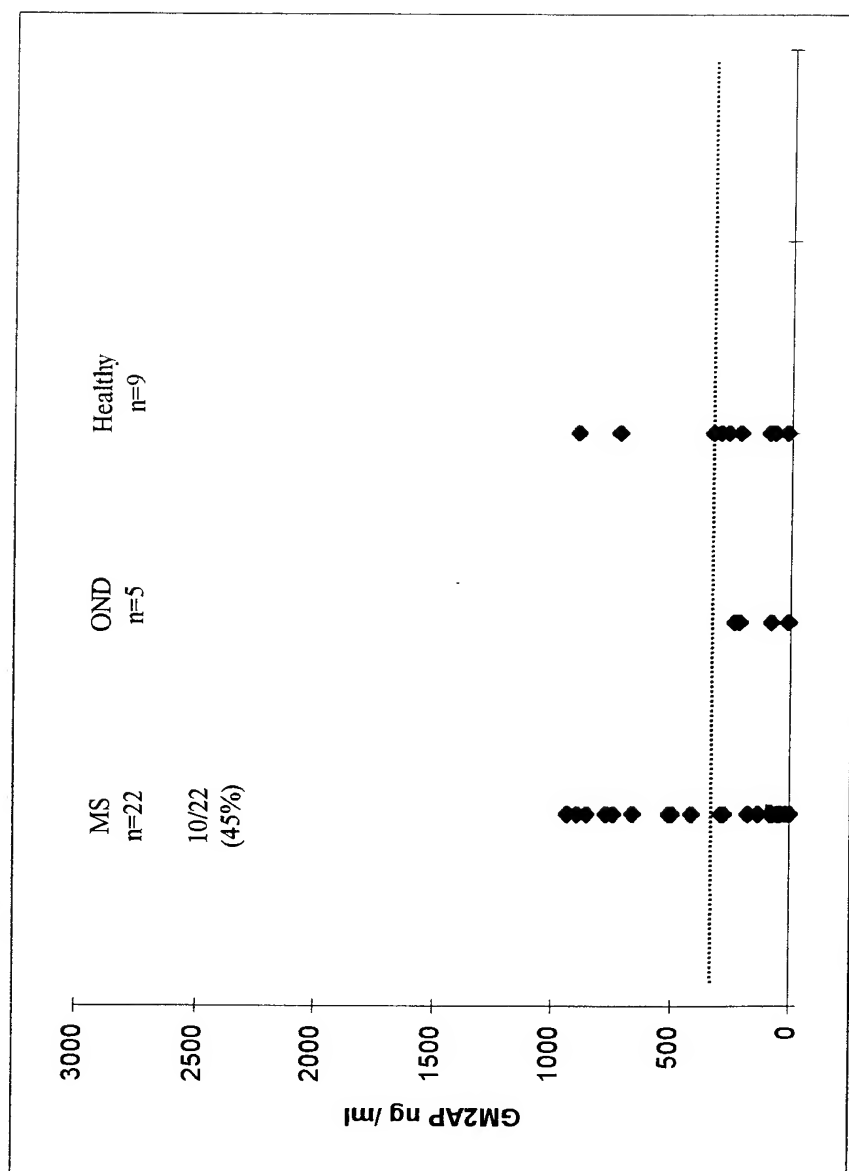
Figure 8

Figure 9

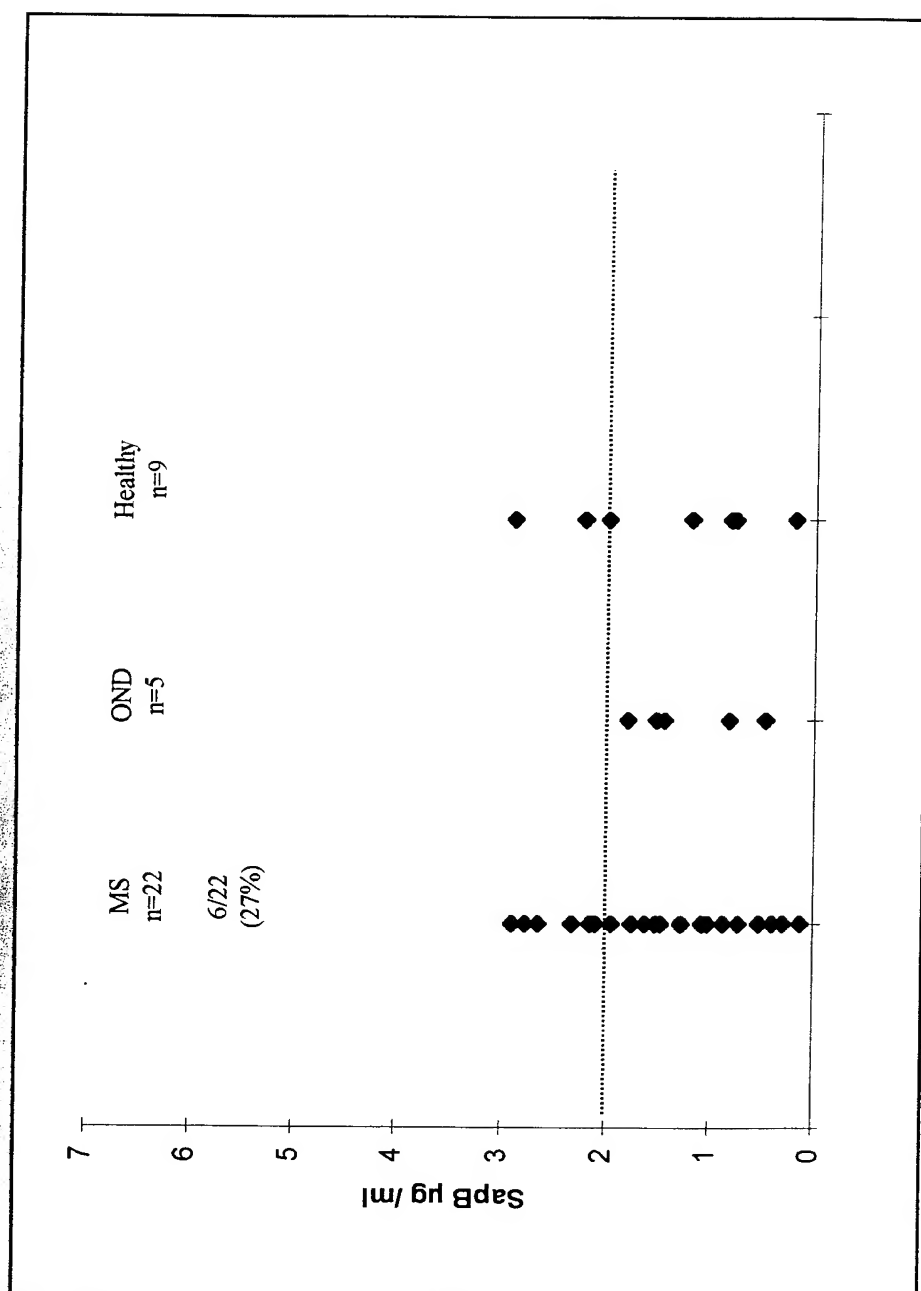
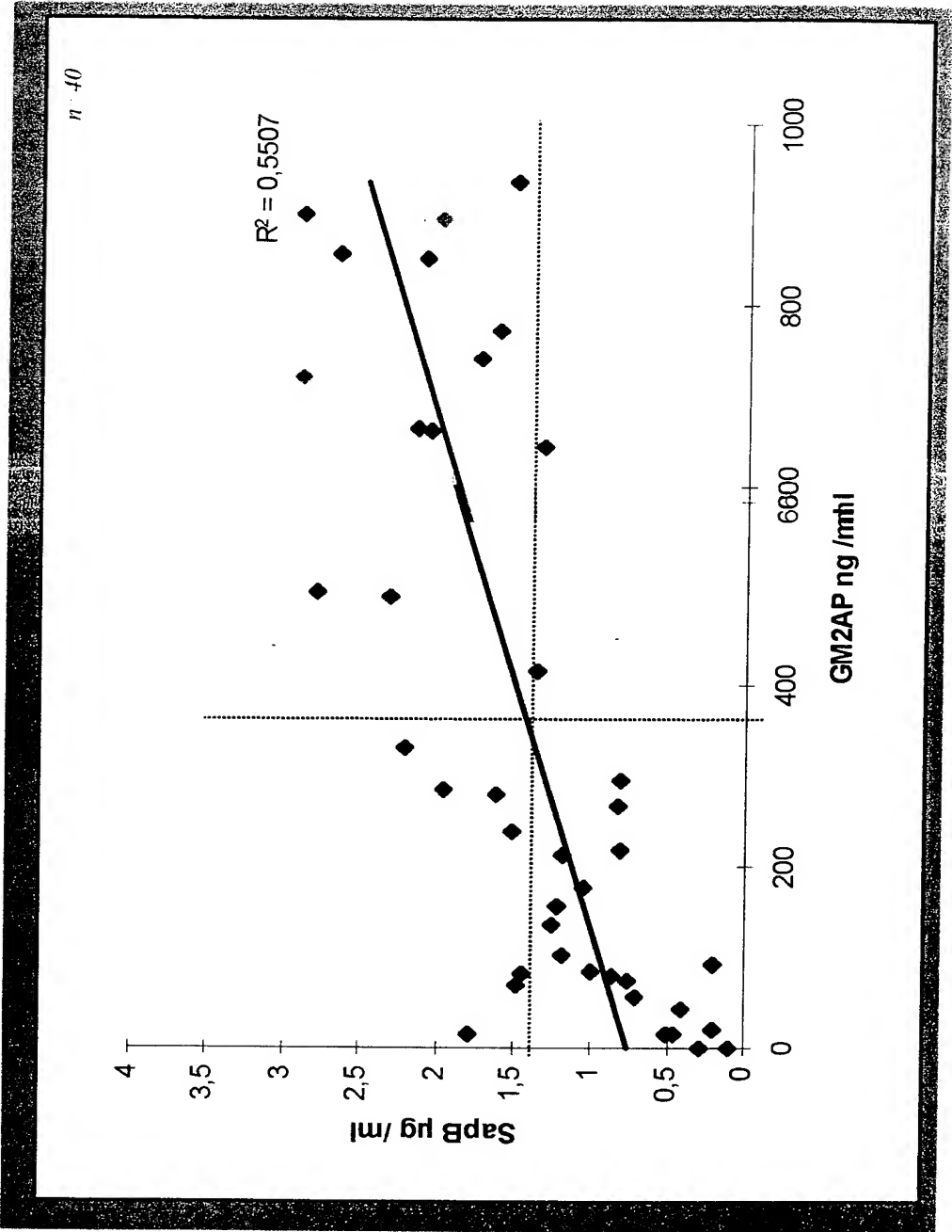
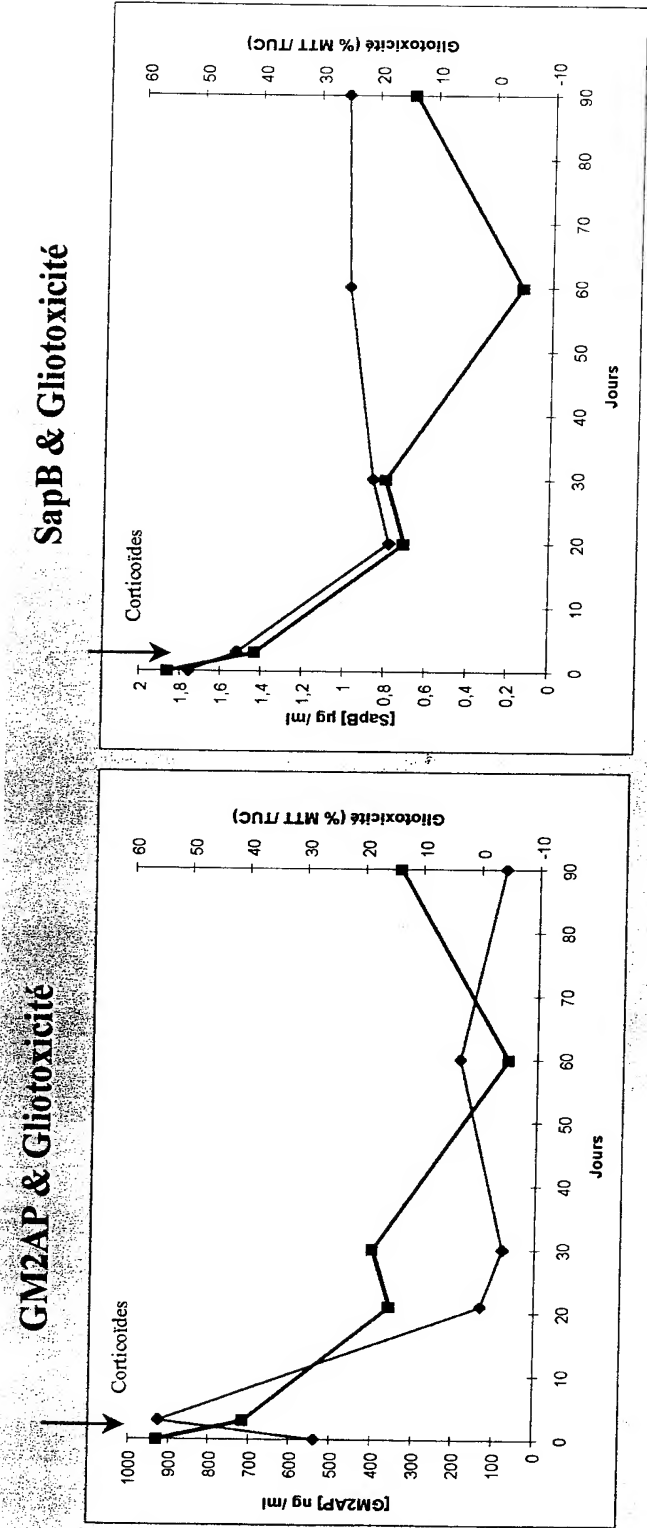


Figure 10



◆ MS
◆ Healthy
◆ AMN

Figure 11
Patient SEP forme Rémittent Progressive



12/18

Figure 12

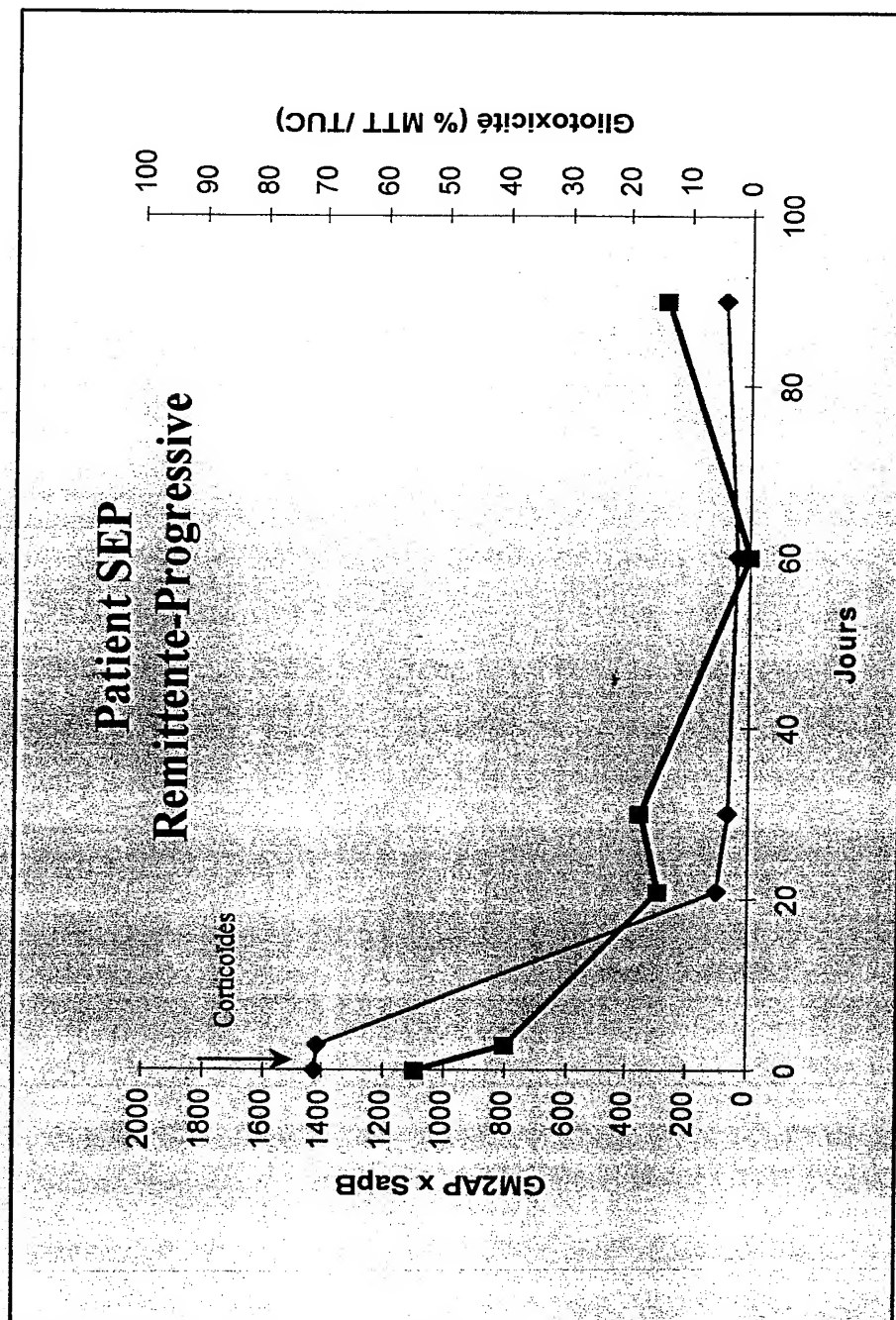
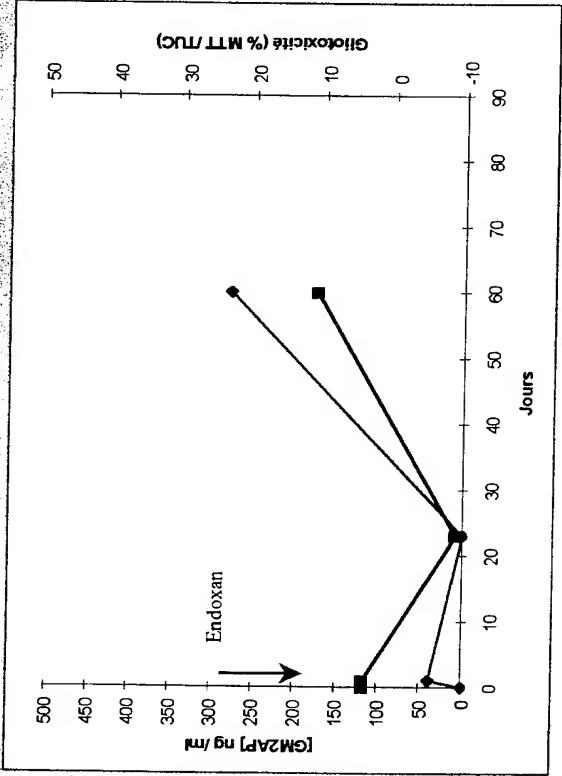


Figure 13

Patient SEP - Progressive

GM2AP & Gliotoxigicite



SapB & Gliotoxigicite

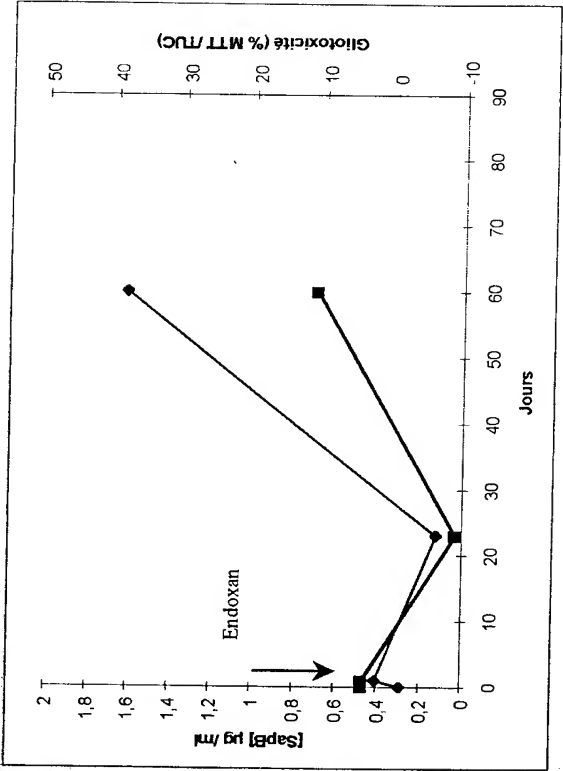


Figure 14

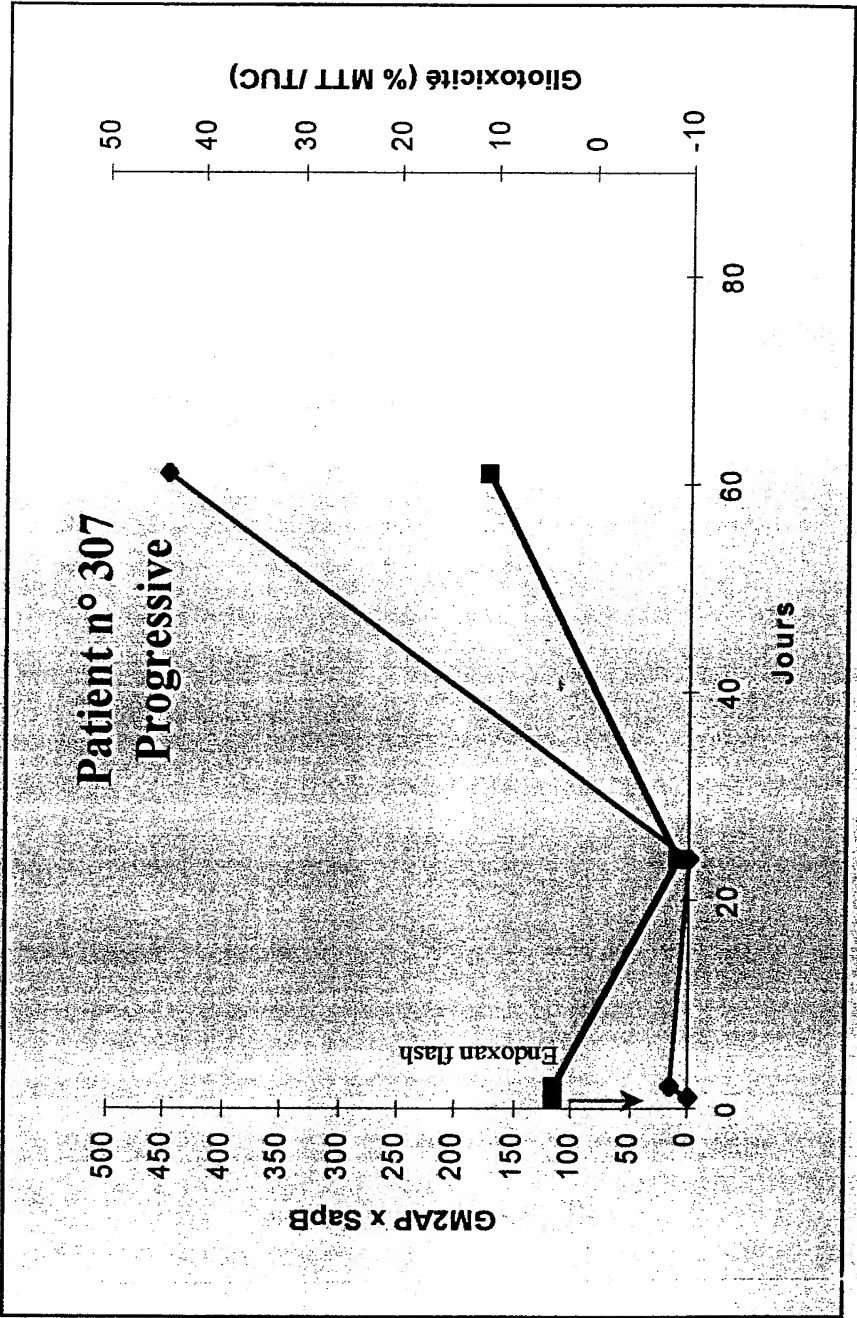
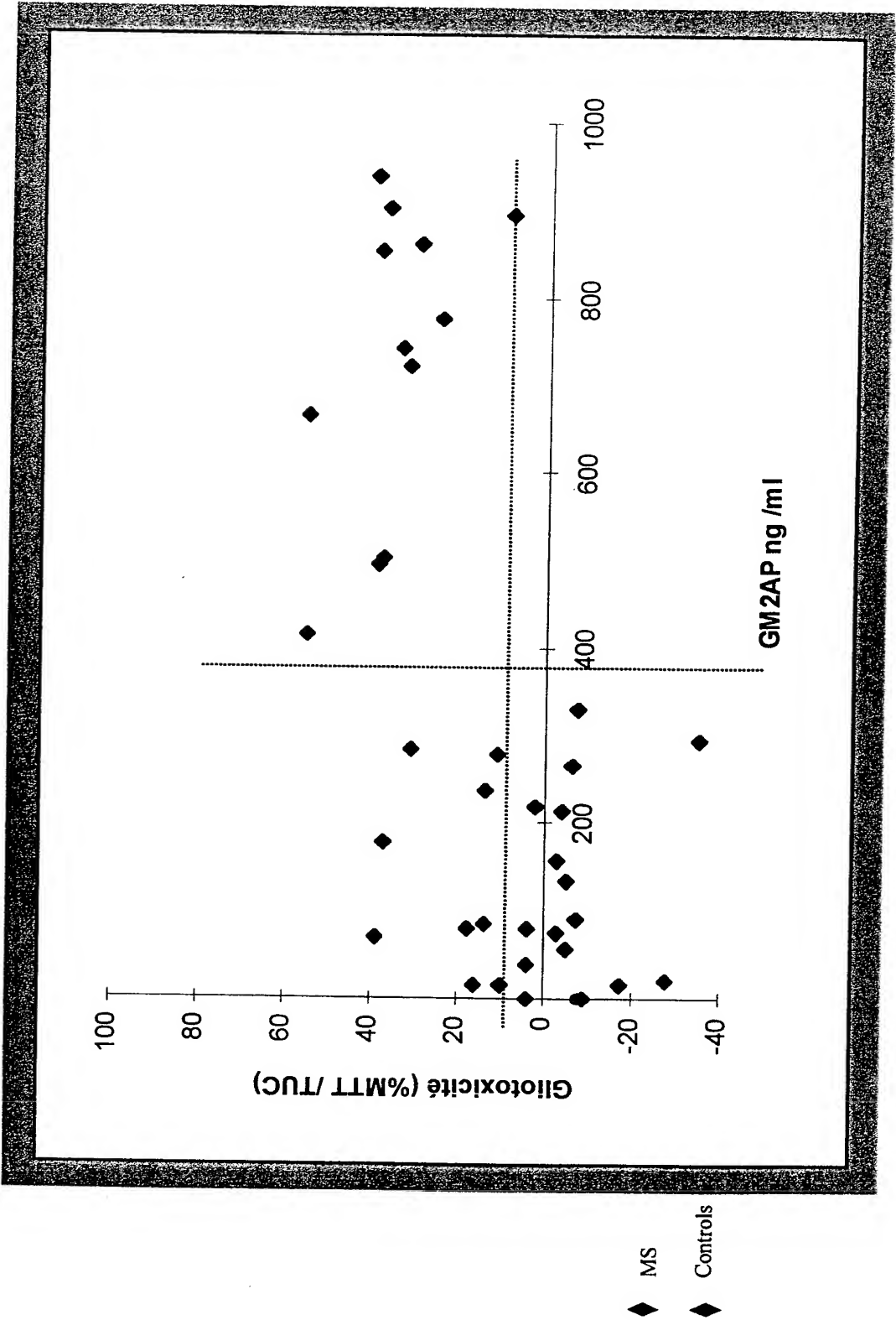
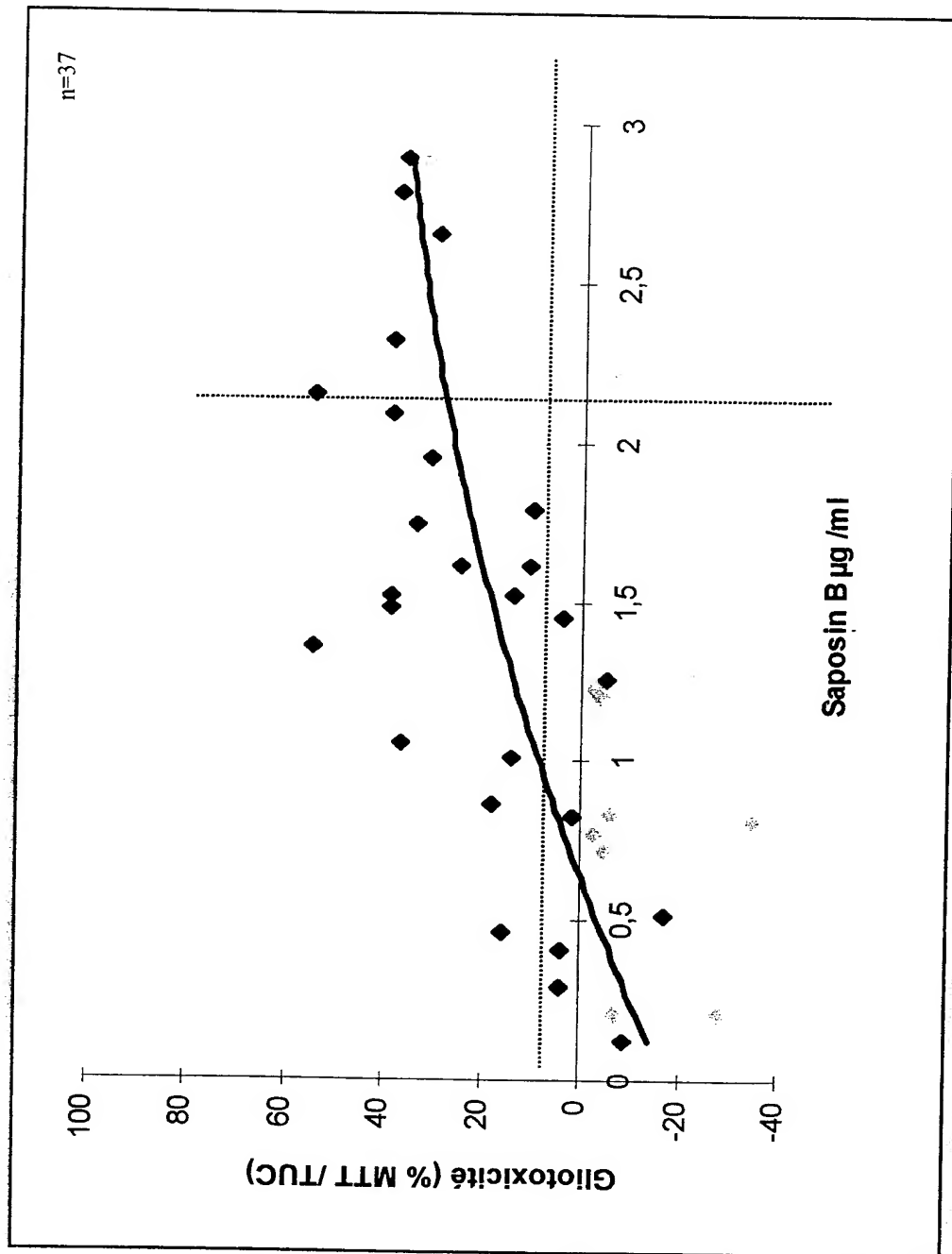


Figure 15



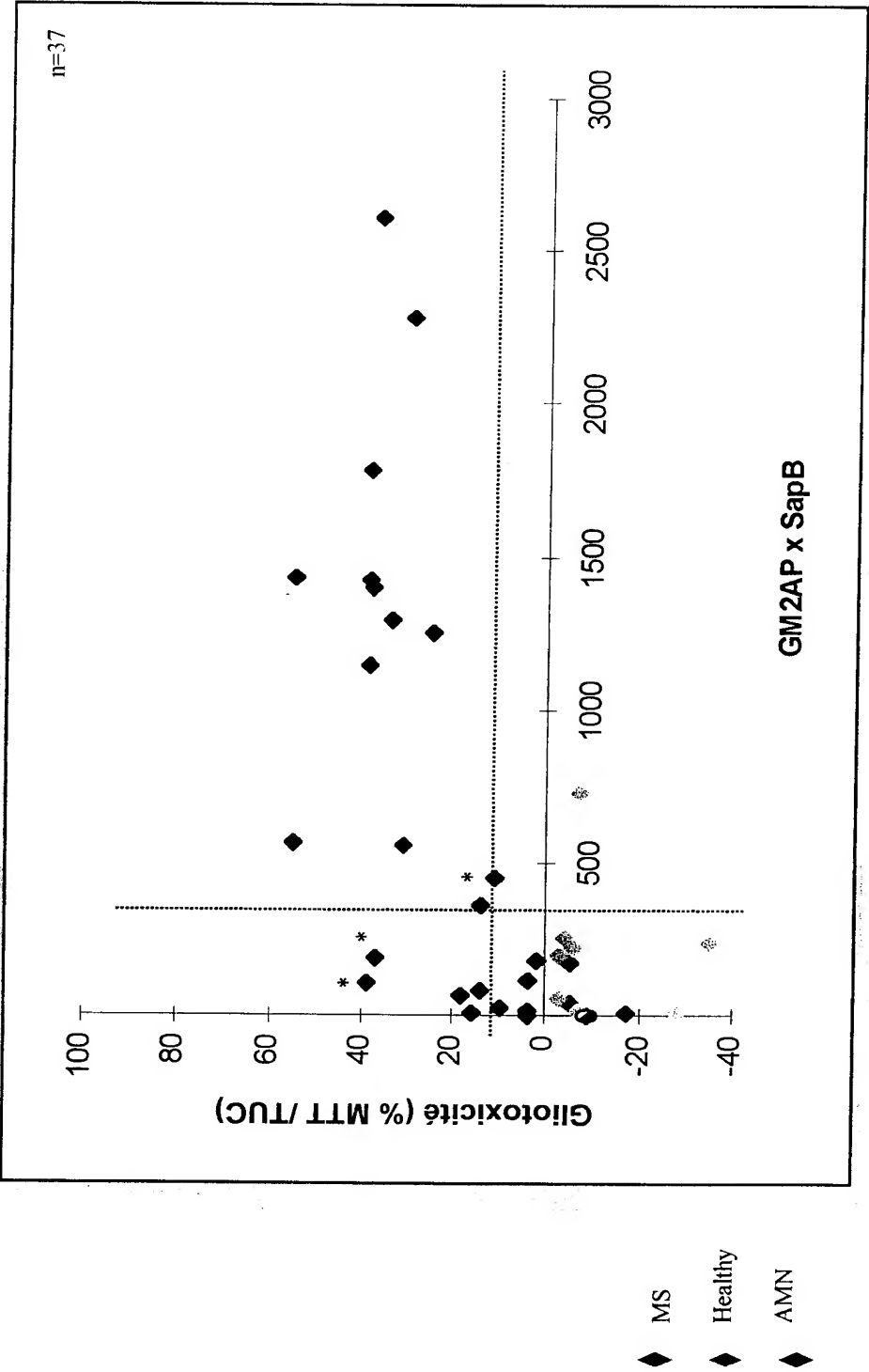
16/18

Figure 16



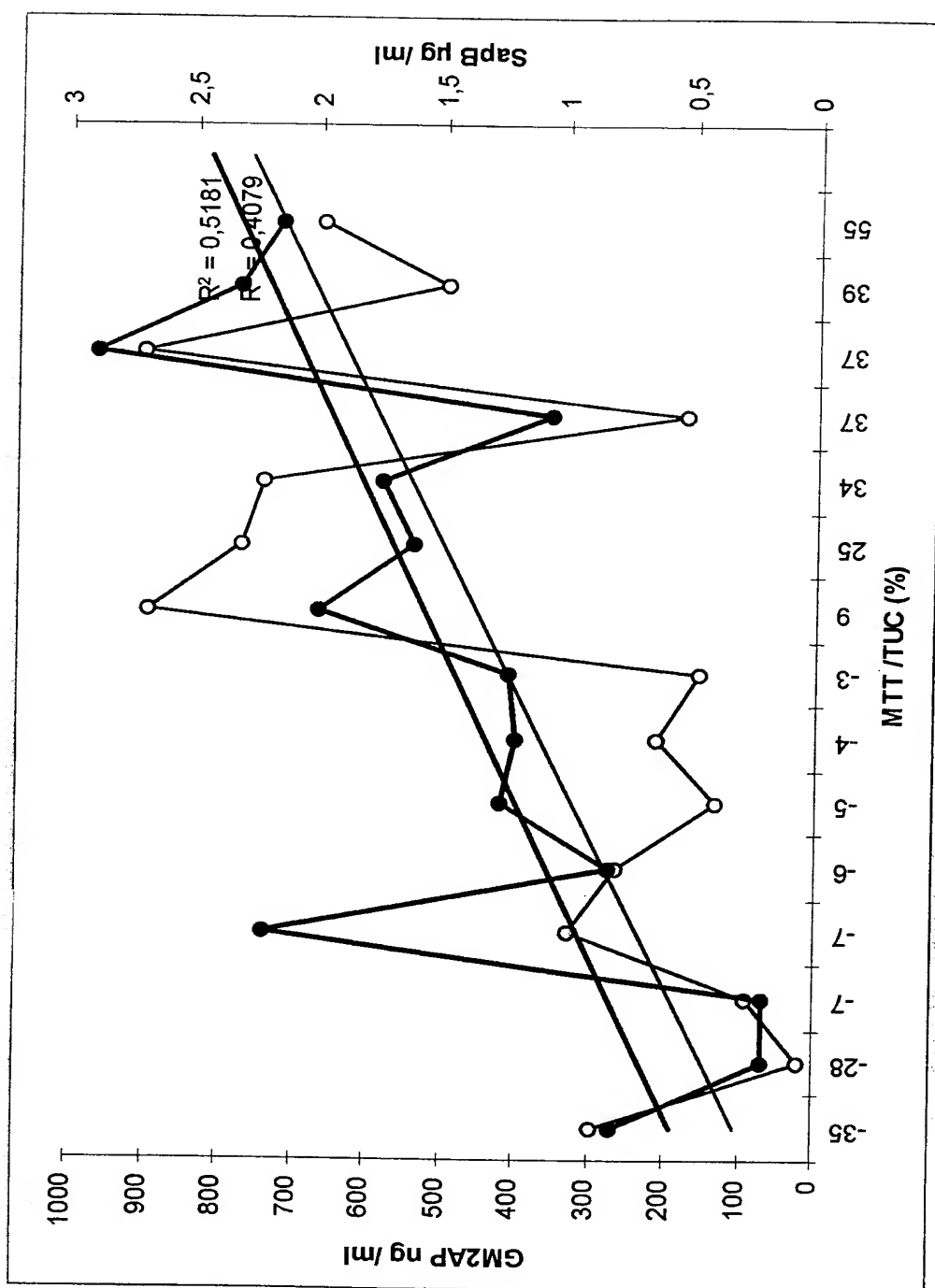
◆ MS
◊ Healthy
◆ AMN

Figure 17



18/18

Figure 18



LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOMERIEUX STELHYS

5 <120> Utilisation d'un polypeptide pour détecter, prévenir ou
traiter un état pathologique associé à une maladie
dégénérative, neurologique ou auto-immune

<130> SEP22

10

<140>

<141>

<150> FR9909372

15 <151> 1999-07-15

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 4393

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

Met Gly Trp Arg Ala Pro Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu His
1 5 10 15

30 Gly Arg Leu Leu Ala Val Thr His Gly Leu Arg Ala Tyr Asp Gly Leu
20 25 30

Ser Leu Pro Glu Asp Ile Glu Thr Val Thr Ala Ser Gln Met Arg Trp
35 40 45

35 Thr His Ser Tyr Leu Ser Asp Asp Glu Asp Met Leu Ala Asp Ser Ile
50 55 60

40 Ser Gly Asp Asp Leu Gly Ser Gly Asp Leu Gly Ser Gly Asp Phe Gln
65 70 75 80

Met Val Tyr Phe Arg Ala Leu Val Asn Phe Thr Arg Ser Ile Glu Tyr
85 90 95

45 Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ala Gly Ser Arg Glu Phe Arg Glu Val Ser
100 105 110

Glu Ala Val Val Asp Thr Leu Glu Ser Glu Tyr Leu Lys Ile Pro Gly
115 120 125

50 Asp Gln Val Val Ser Val Val Phe Ile Lys Glu Leu Asp Gly Trp Val
130 135 140

55 Phe Val Glu Leu Asp Val Gly Ser Glu Gly Asn Ala Asp Gly Ala Gln
145 150 155 160

Ile Gln Glu Met Leu Leu Arg Val Ile Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser
165 170 175

	Tyr	Val	Thr	Ser	Pro	Gln	Gly	Phe	Gln	Phe	Arg	Arg	Leu	Gly	Thr	Val	
				180					185					190			
5	Pro	Gln	Phe	Pro	Arg	Ala	Cys	Thr	Glu	Ala	Glu	Phe	Ala	Cys	His	Ser	
			195					200					205				
	Tyr	Asn	Glu	Cys	Val	Ala	Leu	Glu	Tyr	Arg	Cys	Asp	Arg	Arg	Pro	Asp	
		210					215					220					
10	Cys	Arg	Asp	Met	Ser	Asp	Glu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Pro	Val	Leu	Gly	
	225					230					235					240	
	Ile	Ser	Pro	Thr	Phe	Ser	Leu	Leu	Val	Glu	Thr	Thr	Ser	Leu	Pro	Pro	
15					245					250					255		
	Arg	Pro	Glu	Thr	Thr	Ile	Met	Arg	Gln	Pro	Pro	Val	Thr	His	Ala	Pro	
				260					265					270			
20	Gln	Pro	Leu	Leu	Pro	Gly	Ser	Val	Arg	Pro	Leu	Pro	Cys	Gly	Pro	Gln	
			275					280					285				
	Glu	Ala	Ala	Cys	Arg	Asn	Gly	His	Cys	Ile	Pro	Arg	Asp	Tyr	Leu	Cys	
25		290					295				300						
	Asp	Gly	Gln	Glu	Asp	Cys	Glu	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Leu	Asp	Cys	Gly	
	305					310					315					320	
	Pro	Pro	Pro	Pro	Cys	Glu	Pro	Asn	Glu	Phe	Pro	Cys	Gly	Asn	Gly	His	
30					325					330					335		
	Cys	Ala	Leu	Lys	Leu	Trp	Arg	Cys	Asp	Gly	Asp	Phe	Asp	Cys	Glu	Asp	
				340					345					350			
35	Arg	Thr	Asp	Glu	Ala	Asn	Cys	Pro	Thr	Lys	Arg	Pro	Glu	Glu	Val	Cys	
			355					360					365				
	Gly	Pro	Thr	Gln	Phe	Arg	Cys	Val	Ser	Thr	Asn	Met	Cys	Ile	Pro	Ala	
		370					375					380					
40	Ser	Phe	His	Cys	Asp	Glu	Glu	Ser	Asp	Cys	Pro	Asp	Arg	Ser	Asp	Glu	
	385					390					395					400	
	Phe	Gly	Cys	Met	Pro	Pro	Gln	Val	Val	Thr	Pro	Pro	Arg	Glu	Ser	Ile	
45					405					410					415		
	Gln	Ala	Ser	Arg	Gly	Gln	Thr	Val	Thr	Phe	Thr	Cys	Val	Ala	Ile	Gly	
				420					425					430			
50	Val	Pro	Ala	Pro	Phe	Leu	Ile	Asn	Trp	Arg	Leu	Asn	Trp	Gly	His	Ile	
			435					440					445				
	Pro	Ser	Gln	Pro	Arg	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Glu	Gly	Gly	Arg	Gly	Thr	
		450					455					460					
55	Leu	Ile	Ile	Arg	Asp	Val	Lys	Glu	Ser	Asp	Gln	Gly	Ala	Tyr	Thr	Cys	
	465					470					475					480	

	Glu	Ala	Met	Asn	Ala	Arg	Gly	Met	Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Asp	Gly	Val	
					485					490					495		
5	Leu	Glu	Leu	Val	Pro	Gln	Arg	Ala	Gly	Pro	Cys	Pro	Asp	Gly	His	Phe	
				500					505					510			
	Tyr	Leu	Glu	His	Ser	Ala	Ala	Cys	Leu	Pro	Cys	Phe	Cys	Phe	Gly	Ile	
			515					520					525				
10	Thr	Ser	Val	Cys	Gln	Ser	Thr	Arg	Arg	Phe	Arg	Asp	Gln	Ile	Arg	Leu	
			530				535					540					
	Arg	Phe	Asp	Gln	Pro	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Val	Asn	Val	Thr	Met	Pro	
	545					550					555					560	
15	Ala	Gln	Pro	Gly	Thr	Pro	Pro	Leu	Ser	Ser	Thr	Gln	Leu	Gln	Ile	Asp	
					565					570					575		
20	Pro	Ser	Leu	His	Glu	Phe	Gln	Leu	Val	Asp	Leu	Ser	Arg	Arg	Phe	Leu	
				580					585					590			
	Val	His	Asp	Ser	Phe	Trp	Ala	Leu	Pro	Glu	Gln	Phe	Leu	Gly	Asn	Lys	
			595					600					605				
25	Val	Asp	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Tyr	Asn	Val	Arg	Tyr	Glu	Leu	
		610					615					620					
	Ala	Arg	Gly	Met	Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Arg	Pro	Asp	Val	Val	Leu	Val	
	625					630					635					640	
30	Gly	Ala	Gly	Tyr	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg	Gly	His	Thr	Pro	Thr	Gln	Pro	
					645					650					655		
35	Gly	Ala	Leu	Asn	Gln	Arg	Gln	Val	Gln	Phe	Ser	Glu	Glu	His	Trp	Val	
				660					665					670			
	His	Glu	Ser	Gly	Arg	Pro	Val	Gln	Arg	Ala	Glu	Leu	Leu	Gln	Val	Leu	
			675					680					685				
40	Gln	Ser	Leu	Glu	Ala	Val	Leu	Ile	Gln	Thr	Val	Tyr	Asn	Thr	Lys	Met	
		690					695					700					
	Ala	Ser	Val	Gly	Leu	Ser	Asp	Ile	Ala	Met	Asp	Thr	Thr	Val	Thr	His	
	705					710					715					720	
45	Ala	Thr	Ser	His	Gly	Arg	Ala	His	Ser	Val	Glu	Glu	Cys	Arg	Cys	Pro	
					725					730					735		
50	Ile	Gly	Tyr	Ser	Gly	Leu	Ser	Cys	Glu	Ser	Cys	Asp	Ala	His	Phe	Thr	
				740					745					750			
	Arg	Val	Pro	Gly	Gly	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys	Ser	Gly	Cys	Ser	Cys	
				755				760					765				
55	Asn	Gly	His	Ala	Ser	Ser	Cys	Asp	Pro	Val	Tyr	Gly	His	Cys	Leu	Asn	
		770					775					780					
	Cys	Gln	His	Asn	Thr	Glu	Gly	Pro	Gln	Cys	Lys	Lys	Cys	Lys	Ala	Gly	

	785		790		795		800
	Phe Phe Gly Asp	Ala Met Lys Ala Thr	Ala Thr Ser Cys Arg	Pro Cys			
		805	810	815			
5	Pro Cys Pro Tyr	Ile Asp Ala Ser Arg	Arg Phe Ser Asp	Thr Cys Phe			
		820	825	830			
10	Leu Asp Thr Asp	Gly Gln Ala Thr Cys	Asp Ala Cys Ala	Pro Gly Tyr			
		835	840	845			
	Thr Gly Arg Arg	Cys Glu Ser Cys Ala	Pro Gly Tyr Glu	Gly Asn Pro			
		850	855	860			
15	Ile Gln Pro Gly	Gly Lys Cys Arg Pro	Val Asn Gln Glu	Ile Val Arg			
		865	870	875	880		
	Cys Asp Glu Arg	Gly Ser Met Gly Thr	Ser Gly Glu Ala	Cys Arg Cys			
		885	890	895			
20	Lys Asn Asn Val	Val Gly Arg Leu Cys	Asn Glu Cys Ala	Asp Arg Ser			
		900	905	910			
25	Phe His Leu Ser	Thr Arg Asn Pro Asp	Gly Cys Leu Lys	Cys Phe Cys			
		915	920	925			
	Met Gly Val Ser	Arg His Cys Thr Ser	Ser Ser Trp Ser	Arg Ala Gln			
		930	935	940			
30	Leu His Gly Ala	Ser Glu Glu Pro Gly	His Phe Ser Leu	Thr Asn Ala			
		945	950	955	960		
	Ala Ser Thr His	Thr Thr Asn Glu Gly	Ile Phe Ser Pro	Thr Pro Gly			
		965	970	975			
35	Glu Leu Gly Phe	Ser Ser Phe His Arg	Leu Leu Ser Gly	Pro Tyr Phe			
		980	985	990			
40	Trp Ser Leu Pro	Ser Arg Phe Leu Gly	Asp Lys Val Thr	Ser Tyr Gly			
		995	1000	1005			
	Gly Glu Leu Arg	Phe Thr Val Thr	Gln Arg Ser Gln	Pro Gly Ser Thr			
		1010	1015	1020			
45	Pro Leu His Gly	Gln Pro Leu Val Val	Leu Gln Gly Asn	Asn Ile Ile			
		1025	1030	1035	1040		
	Leu Glu His His	Val Ala Gln Glu Pro	Ser Pro Gly Gln	Pro Ser Thr			
		1045	1050	1055			
50	Phe Ile Val Pro	Phe Arg Glu Gln Ala	Trp Gln Arg Pro	Asp Gly Gln			
		1060	1065	1070			
55	Pro Ala Thr Arg	Glu His Leu Leu Met	Ala Leu Ala Gly	Ile Asp Thr			
		1075	1080	1085			
	Leu Leu Ile Arg	Ala Ser Tyr Ala Gln	Gln Pro Ala Glu	Ser Arg Val			
		1090	1095	1100			

Ser Gly Ile Ser Met Asp Val Ala Val Pro Glu Glu Thr Gly Gln Asp
 1105 1110 1115 1120

5 Pro Ala Leu Glu Val Glu Gln Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Gly
 1125 1130 1135

Pro Ser Cys Gln Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Thr Arg Thr Pro Ser Gly
 1140 1145 1150

10 Leu Tyr Leu Gly Thr Cys Glu Arg Cys Ser Cys His Gly His Ser Glu
 1155 1160 1165

Ala Cys Glu Pro Glu Thr Gly Ala Cys Gln Gly Cys Gln His His Thr
 15 1170 1175 1180

Glu Gly Pro Arg Cys Glu Gln Cys Gln Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala
 1185 1190 1195 1200

20 Gln Arg Gly Thr Pro Gln Asp Cys Gln Leu Cys Pro Cys Tyr Gly Asp
 1205 1210 1215

Pro Ala Ala Gly Gln Ala Ala His Thr Cys Phe Leu Asp Thr Asp Gly
 1220 1225 1230

25 His Pro Thr Cys Asp Ala Cys Ser Pro Gly His Ser Gly Arg His Cys
 1235 1240 1245

Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Ser Gln Gly Gln Pro
 30 1250 1255 1260

Cys Gln Arg Asp Ser Gln Val Pro Gly Pro Ile Gly Cys Asn Cys Asp
 1265 1270 1275 1280

35 Pro Gln Gly Ser Val Ser Ser Gln Cys Asp Ala Ala Gly Gln Cys Gln
 1285 1290 1295

Cys Lys Ala Gln Val Glu Gly Leu Thr Cys Ser His Cys Arg Pro His
 1300 1305 1310

40 His Phe His Leu Ser Ala Ser Asn Pro Asp Gly Cys Leu Pro Cys Phe
 1315 1320 1325

Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser Ala Tyr Thr Arg His
 45 1330 1335 1340

Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe Gln Gly Phe Ala Leu
 1345 1350 1355 1360

50 Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly Glu Phe Thr Val Glu
 1365 1370 1375

Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly Asn Phe Ala Gln Leu
 1380 1385 1390

55 Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp Gln Leu Pro Glu Thr Tyr Gln Gly Asp
 1395 1400 1405

Lys Val Ala Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Arg Tyr Thr Leu Ser Tyr Thr
 1410 1415 1420
 Ala Gly Pro Gln Gly Ser Pro Leu Ser Asp Pro Asp Val Gln Ile Thr
 5 1425 1430 1435 1440
 Gly Asn Asn Ile Met Leu Val Ala Ser Gln Pro Ala Leu Gln Gly Pro
 1445 1450 1455
 10 Glu Arg Arg Ser Tyr Glu Ile Met Phe Arg Glu Glu Phe Trp Arg Arg
 1460 1465 1470
 Pro Asp Gly Gln Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala
 1475 1480 1485
 15 Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala Thr Phe Ser Ser Val Pro Leu
 1490 1495 1500
 Val Ala Ser Ile Ser Ala Val Ser Leu Glu Val Ala Gln Pro Gly Pro
 20 1505 1510 1515 1520
 Ser Asn Arg Pro Arg Ala Leu Glu Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro Pro
 1525 1530 1535
 25 Gly Tyr Ile Gly Leu Ser Cys Gln Asp Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Arg
 1540 1545 1550
 Thr Gly Ser Gly Leu Tyr Leu Gly His Cys Glu Leu Cys Glu Cys Asn
 1555 1560 1565
 30 Gly His Ser Asp Leu Cys His Pro Glu Thr Gly Ala Cys Ser Gln Cys
 1570 1575 1580
 Gln His Asn Ala Ala Gly Glu Phe Cys Glu Leu Cys Ala Pro Gly Tyr
 35 1585 1590 1595 1600
 Tyr Gly Asp Ala Thr Ala Gly Thr Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala
 1605 1610 1615
 40 Cys Pro Leu Thr Asn Pro Glu Asn Met Phe Ser Arg Thr Cys Glu Ser
 1620 1625 1630
 Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr
 1635 1640 1645
 45 Gly Gln Tyr Cys Glu Gln Cys Gly Pro Gly Tyr Val Gly Asn Pro Ser
 1650 1655 1660
 Val Gln Gly Gly Gln Cys Leu Pro Glu Thr Asn Gln Ala Pro Leu Val
 50 1665 1670 1675 1680
 Val Glu Val His Pro Ala Arg Ser Ile Val Pro Gln Gly Gly Ser His
 1685 1690 1695
 55 Ser Leu Arg Cys Gln Val Ser Gly Arg Gly Pro His Tyr Phe Tyr Trp
 1700 1705 1710
 Ser Arg Glu Asp Gly Arg Pro Val Pro Ser Gly Thr Gln Gln Arg His

	1715	1720	1725
	Gln Gly Ser Glu Leu His Phe Pro Ser Val Gln Pro Ser Asp Ala Gly		
	1730	1735	1740
5	Val Tyr Ile Cys Thr Cys Arg Asn Leu His Arg Ser Asn Thr Ser Arg		
	1745	1750	1755 1760
10	Ala Glu Leu Leu Val Thr Glu Ala Pro Ser Lys Pro Ile Thr Val Thr		
	1765	1770	1775
	Val Glu Glu Gln Arg Ser Gln Ser Val Arg Pro Gly Ala Asp Val Thr		
	1780	1785	1790
15	Phe Ile Cys Thr Ala Lys Ser Lys Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Val Trp		
	1795	1800	1805
	Thr Arg Leu His Asn Gly Lys Leu Pro Thr Arg Ala Met Asp Phe Asn		
	1810	1815	1820
20	Gly Ile Leu Thr Ile Arg Asn Val Gln Leu Ser Asp Ala Gly Thr Tyr		
	1825	1830	1835 1840
	Val Cys Thr Gly Ser Asn Met Phe Ala Met Asp Gln Gly Thr Ala Thr		
25	1845	1850	1855
	Leu His Val Gln Ala Ser Gly Thr Leu Ser Ala Pro Val Val Ser Ile		
	1860	1865	1870
30	His Pro Pro Gln Leu Thr Val Gln Pro Gly Gln Leu Ala Glu Phe Arg		
	1875	1880	1885
	Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Thr Pro Thr Leu Glu Trp Thr Gly Gly		
	1890	1895	1900
35	Pro Gly Gly Gln Leu Pro Ala Lys Ala Gln Ile His Gly Gly Ile Leu		
	1905	1910	1915 1920
	Arg Leu Pro Ala Val Glu Pro Thr Asp Gln Ala Gln Tyr Leu Cys Arg		
40	1925	1930	1935
	Ala His Ser Ser Ala Gly Gln Gln Val Ala Arg Ala Val Leu His Val		
	1940	1945	1950
45	His Gly Gly Gly Gly Pro Arg Val Gln Val Ser Pro Glu Arg Thr Gln		
	1955	1960	1965
	Val His Ala Gly Arg Thr Val Arg Leu Tyr Cys Arg Ala Ala Gly Val		
	1970	1975	1980
50	Pro Ser Ala Thr Ile Thr Trp Arg Lys Glu Gly Gly Ser Leu Pro Pro		
	1985	1990	1995 2000
	Gln Ala Arg Ser Glu Arg Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Ile Pro Ala		
55	2005	2010	2015
	Ile Thr Thr Ala Asp Ala Gly Phe Tyr Leu Cys Val Ala Thr Ser Pro		
	2020	2025	2030

Ala Gly Thr Ala Gln Ala Arg Ile Gln Val Val Val Leu Ser Ala Ser
 2035 2040 2045
 5 Asp Ala Ser Gln Pro Pro Val Lys Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ser Val
 2050 2055 2060
 Thr Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala Gly Ser Ala
 2065 2070 2075 2080
 10 His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Arg Arg Gly Gly Ser Leu Pro His His
 2085 2090 2095
 Thr Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Pro Gln Val Ser Pro Ala
 15 2100 2105 2110
 Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Glu Asn Gly Ser Gly Pro Lys
 2115 2120 2125
 20 Glu Ala Ser Ile Thr Val Ser Val Leu His Gly Thr His Ser Gly Pro
 2130 2135 2140
 Ser Tyr Thr Pro Val Pro Gly Ser Thr Arg Pro Ile Arg Ile Glu Pro
 2145 2150 2155 2160
 25 Ser Ser Ser His Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val
 2165 2170 2175
 Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly
 30 2180 2185 2190
 Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu His
 2195 2200 2205
 35 Gln Val Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Val Gly
 2210 2215 2220
 Thr Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser
 2225 2230 2235 2240
 40 Val Ile Pro Gly Pro Ile Pro Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser
 2245 2250 2255
 Thr Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Ser Cys Val Val Ala Gly
 45 2260 2265 2270
 Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2275 2280 2285
 50 Ala Arg His Gln Val Arg Gly Ser Arg Leu Tyr Ile Phe Gln Ala Ser
 2290 2295 2300
 Pro Ala Asp Ala Gly Gln Tyr Val Cys Arg Ala Ser Asn Gly Met Glu
 2305 2310 2315 2320
 55 Ala Ser Ile Thr Val Thr Val Thr Gly Thr Gln Gly Ala Asn Leu Ala
 2325 2330 2335

Tyr Pro Ala Gly Ser Thr Gln Pro Ile Arg Ile Glu Pro Ser Ser Ser
 2340 2345 2350

5 Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly
 2355 2360 2365

Gln Ser His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2370 2375 2380

10 Val Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Ala Ser
 2385 2390 2395 2400

Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Leu Gly Ser Ser Val
 2405 2410 2415

15 Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Pro Ala Gly Ser Val
 2420 2425 2430

20 Pro Ala Leu Gly Val Thr Pro Thr Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser
 2435 2440 2445

Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala Gly
 2450 2455 2460

25 Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro
 2465 2470 2475 2480

Ala Arg His Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Leu Gln Val Thr
 2485 2490 2495

30 Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Val Gly Ser Ser Gly
 2500 2505 2510

35 Thr Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Gln Gln Arg Leu Ser Gly
 2515 2520 2525

Ser His Ser Gln Gly Val Ala Tyr Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser
 2530 2535 2540

40 Ala Ser Leu Ala Asn Gly His Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala
 2545 2550 2555 2560

Ser Gln Ala Pro His Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu
 2565 2570 2575

45 Pro Ser Arg His Gln Ile Val Gly Ser Arg Leu Arg Ile Pro Gln Val
 2580 2585 2590

50 Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Ser Asn Gly Ala
 2595 2600 2605

Gly Ser Arg Glu Thr Ser Leu Ile Val Thr Ile Gln Gly Ser Gly Ser
 2610 2615 2620

55 Ser His Val Pro Arg Val Ser Pro Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser Ser
 2625 2630 2635 2640

Pro Thr Val Val Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala

	2645	2650	2655
	Arg Gln Pro Gln Ala Ile Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu		
	2660	2665	2670
5	Pro Ser Arg His Gln Thr His Gly Ser His Leu Arg Leu His Gln Met		
	2675	2680	2685
10	Ser Val Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Ala Asn Asn Asn Ile		
	2690	2695	2700
	Asp Ala Leu Glu Ala Ser Ile Val Ile Ser Val Ser Pro Ser Ala Gly		
	2705	2710	2715 2720
15	Ser Pro Ser Ala Pro Gly Ser Ser Met Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser		
	2725	2730	2735
	Ser Ser His Val Ala Glu Gly Glu Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val		
	2740	2745	2750
20	Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser		
	2755	2760	2765
25	Leu Pro Ser Tyr His Gln Thr Arg Gly Ser Arg Leu Arg Leu His His		
	2770	2775	2780
	Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Met Gly Ser		
	2785	2790	2795 2800
30	Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser Gly		
	2805	2810	2815
	Ser Ser Ala Val His Val Pro Ala Pro Gly Gly Ala Pro Pro Ile Arg		
	2820	2825	2830
35	Ile Glu Pro Ser Ser Ser Arg Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu		
	2835	2840	2845
40	Lys Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys		
	2850	2855	2860
	Arg Gly Gly Asn Leu Pro Ala Arg His Gln Val His Gly Pro Leu Leu		
	2865	2870	2875 2880
45	Arg Leu Asn Gln Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Ser Cys Gln		
	2885	2890	2895
	Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile		
	2900	2905	2910
50	Glu Pro Ser Ser Pro Gly Pro Ile Pro Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro		
	2915	2920	2925
55	Ile Tyr Ile Glu Ala Ser Ser Ser His Val Thr Glu Gly Gln Thr Leu		
	2930	2935	2940
	Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp		
	2945	2950	2955 2960

	Tyr	Lys	Arg	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg	His	Gln	Thr	His	Gly	Ser	
																	2965
																	2970
																	2975
5	Gln	Leu	Arg	Leu	His	His	Val	Ser	Pro	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Val	
																	2980
																	2985
																	2990
	Cys	Arg	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Gln	Glu	Ala	Ser	Phe	Thr	
																	2995
																	3000
																	3005
10	Val	Thr	Val	Pro	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Tyr	Arg	Leu	Arg	Ser	Pro	
																	3010
																	3015
																	3020
	Val	Ile	Ser	Ile	Asp	Pro	Pro	Ser	Ser	Thr	Val	Gln	Gln	Gly	Gln	Asp	
15																	3025
																	3030
																	3035
	Ala	Ser	Phe	Lys	Cys	Leu	Ile	His	Asp	Gly	Ala	Ala	Pro	Ile	Ser	Leu	
																	3045
																	3050
																	3055
20	Glu	Trp	Lys	Thr	Arg	Asn	Gln	Glu	Leu	Glu	Asp	Asn	Val	His	Ile	Ser	
																	3060
																	3065
																	3070
	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Ile	Thr	Ile	Val	Gly	Thr	Arg	Pro	Ser	Asn	His	
																	3075
																	3080
																	3085
25	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Ala	Tyr	Gly	Val	Ala	Gln	Ser	
																	3090
																	3095
																	3100
30	Val	Val	Asn	Leu	Ser	Val	His	Gly	Pro	Pro	Thr	Val	Ser	Val	Leu	Pro	
																	3105
																	3110
																	3115
	Glu	Gly	Pro	Val	Trp	Val	Lys	Val	Gly	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	
																	3125
																	3130
																	3135
35	Val	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Arg	Ser	Ser	Ala	Arg	Trp	Thr</				

Leu Ile Ile Pro Arg Val Ala Gln Gln Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Cys
 3265 3270 3275 3280
 5 Asn Ala Thr Ser Pro Ala Gly His Ala Glu Ala Thr Ile Ile Leu His
 3285 3290 3295
 Val Glu Ser Pro Pro Tyr Ala Thr Thr Val Pro Glu His Ala Ser Val
 3300 3305 3310
 10 Gln Ala Gly Glu Thr Val Gln Leu Gln Cys Leu Ala His Gly Thr Pro
 3315 3320 3325
 Pro Leu Thr Phe Gln Trp Ser Arg Val Gly Ser Ser Leu Pro Gly Arg
 3330 3335 3340
 15 Ala Thr Ala Arg Asn Glu Leu Leu His Phe Glu Arg Ala Ala Pro Glu
 3345 3350 3355 3360
 20 Asp Ser Gly Arg Tyr Arg Cys Arg Val Thr Asn Lys Val Gly Ser Ala
 3365 3370 3375
 Glu Ala Phe Ala Gln Leu Leu Val Gln Gly Pro Pro Gly Ser Leu Pro
 3380 3385 3390
 25 Ala Thr Ser Ile Pro Ala Gly Ser Thr Pro Thr Val Gln Val Thr Pro
 3395 3400 3405
 Gln Leu Glu Thr Lys Ser Ile Gly Ala Ser Val Glu Phe His Cys Ala
 3410 3415 3420
 30 Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Gln Leu Arg Trp Phe Lys Glu Gly Gly
 3425 3430 3435 3440
 Gln Leu Pro Pro Gly His Ser Val Gln Asp Gly Val Leu Arg Ile Gln
 3445 3450 3455
 35 Asn Leu Asp Gln Ser Cys Gln Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Ala His Gly
 3460 3465 3470
 40 Pro Trp Gly Lys Ala Gln Ala Ser Ala Gln Leu Val Ile Gln Ala Leu
 3475 3480 3485
 Pro Ser Val Leu Ile Asn Ile Arg Thr Ser Val Gln Thr Val Val Val
 3490 3495 3500
 45 Gly His Ala Val Glu Phe Glu Cys Leu Ala Leu Gly Asp Pro Lys Pro
 3505 3510 3515 3520
 Gln Val Thr Trp Ser Lys Val Gly Gly His Leu Arg Pro Gly Ile Val
 3525 3530 3535
 50 Gln Ser Gly Gly Val Val Arg Ile Ala His Val Glu Leu Ala Asp Ala
 3540 3545 3550
 55 Gly Gln Tyr Arg Cys Thr Ala Thr Asn Ala Ala Gly Thr Thr Gln Ser
 3555 3560 3565
 His Val Leu Leu Leu Val Gln Ala Leu Pro Gln Ile Ser Met Pro Gln

	3570		3575		3580	
	Glu Val Arg Val Pro Ala Gly Ser Ala Ala Val Phe Pro Cys Ile Ala					
	3585		3590		3595	3600
5	Ser Gly Tyr Pro Thr Pro Asp Ile Ser Trp Ser Lys Leu Asp Gly Ser					
		3605		3610		3615
10	Leu Pro Pro Asp Ser Arg Leu Glu Asn Asn Met Leu Met Leu Pro Ser					
		3620		3625		3630
	Val Gln Pro Gln Asp Ala Gly Thr Tyr Val Cys Thr Ala Thr Asn Arg					
		3635		3640		3645
15	Gln Gly Lys Val Lys Ala Phe Ala His Leu Gln Val Pro Glu Arg Val					
		3650		3655		3660
	Val Pro Tyr Phe Thr Gln Thr Pro Tyr Ser Phe Leu Pro Leu Pro Thr					
		3665		3670		3675
20	Ile Lys Asp Ala Tyr Arg Lys Phe Glu Ile Lys Ile Thr Phe Arg Pro					
		3685		3690		3695
25	Asp Ser Ala Asp Gly Met Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Arg Val Pro					
		3700		3705		3710
	Gly Ser Pro Thr Asn Leu Ala Asn Arg Gln Pro Asp Phe Ile Ser Phe					
		3715		3720		3725
30	Gly Leu Val Gly Gly Arg Pro Glu Phe Arg Phe Asp Ala Gly Ser Gly					
		3730		3735		3740
	Met Ala Thr Ile Arg His Pro Thr Pro Leu Ala Leu Gly His Phe His					
		3745		3750		3755
35	Thr Val Thr Leu Leu Arg Ser Leu Thr Gln Gly Ser Leu Ile Val Gly					
		3765		3770		3775
40	Asp Leu Ala Pro Val Asn Gly Thr Ser Gln Gly Lys Phe Gln Gly Leu					
		3780		3785		3790
	Asp Leu Asn Glu Glu Leu Tyr Leu Gly Gly Tyr Pro Asp Tyr Gly Ala					
		3795		3800		3805
45	Ile Pro Lys Ala Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ile Gly Cys Val Arg Glu					
		3810		3815		3820
	Leu Arg Ile Gln Gly Glu Glu Ile Val Phe His Asp Leu Asn Leu Thr					
		3825		3830		3835
50	Ala His Gly Ile Ser His Cys Pro Thr Cys Arg Asp Arg Pro Cys Gln					
		3845		3850		3855
55	Asn Gly Gly Gln Cys His Asp Ser Glu Ser Ser Ser Tyr Val Cys Val					
		3860		3865		3870
	Cys Pro Ala Gly Phe Thr Gly Ser Arg Cys Glu His Ser Gln Ala Leu					
		3875		3880		3885

His Cys His Pro Glu Ala Cys Gly Pro Asp Ala Thr Cys Val Asn Arg
 3890 3895 3900
 5 Pro Asp Gly Arg Gly Tyr Thr Cys Arg Cys His Leu Gly Arg Ser Gly
 3905 3910 3915 3920
 Leu Arg Cys Glu Glu Gly Val Thr Val Thr Thr Pro Ser Leu Ser Gly
 3925 3930 3935
 10 Ala Gly Ser Tyr Leu Ala Leu Pro Ala Leu Thr Asn Thr His His Glu
 3940 3945 3950
 Leu Arg Leu Asp Val Glu Phe Lys Pro Leu Ala Pro Asp Gly Val Leu
 15 3955 3960 3965
 Leu Phe Ser Gly Gly Lys Ser Gly Pro Val Glu Asp Phe Val Ser Leu
 3970 3975 3980
 20 Ala Met Val Gly Gly His Leu Glu Phe Arg Tyr Glu Leu Gly Ser Gly
 3985 3990 3995 4000
 Leu Ala Val Leu Arg Thr Ala Glu Pro Leu Ala Leu Gly Arg Trp His
 4005 4010 4015
 25 Arg Val Ser Ala Glu Arg Leu Asn Lys Asp Gly Ser Leu Arg Val Asn
 4020 4025 4030
 Gly Gly Arg Pro Val Leu Arg Ser Ser Pro Gly Lys Ser Gln Gly Leu
 30 4035 4040 4045
 Asn Leu His Thr Leu Leu Tyr Leu Gly Gly Val Glu Pro Ser Val Pro
 4050 4055 4060
 35 Leu Ser Pro Ala Thr Asn Met Ser Ala His Phe Arg Gly Cys Val Gly
 4065 4070 4075 4080
 Glu Val Ser Val Asn Gly Lys Arg Leu Asp Leu Thr Tyr Ser Phe Leu
 4085 4090 4095
 40 Gly Ser Gln Gly Ile Gly Gln Cys Tyr Asp Ser Ser Pro Cys Glu Arg
 4100 4105 4110
 Gln Pro Cys Gln His Gly Ala Thr Cys Met Pro Ala Gly Glu Tyr Glu
 45 4115 4120 4125
 Phe Gln Cys Leu Cys Arg Asp Gly Ile Lys Gly Asp Leu Cys Glu His
 4130 4135 4140
 50 Glu Glu Asn Pro Cys Gln Leu Arg Glu Pro Cys Leu His Gly Gly Thr
 4145 4150 4155 4160
 Cys Gln Gly Thr Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly Pro Arg
 4165 4170 4175
 55 Cys Gln Gln Gly Ser Gly His Gly Ile Ala Glu Ser Asp Trp His Leu
 4180 4185 4190

Glu Gly Ser Gly Gly Asn Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe
 4195 4200 4205
 5 His Asp Asp Gly Phe Leu Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser
 4210 4215 4220
 Leu Pro Glu Val Pro Glu Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr
 4225 4230 4235 4240
 10 Ala Ser Gly Leu Leu Leu Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly
 4245 4250 4255
 Gln Gly Lys Asp Phe Ile Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val
 4260 4265 4270
 15 Phe Arg Tyr Gln Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp
 4275 4280 4285
 Pro Ile Asn Asp Gly Glu Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly
 4290 4295 4300
 Arg Arg Gly Ser Ile Gln Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg
 4305 4310 4315 4320
 25 Ser Pro Gly Pro Asn Val Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Ile Tyr Ile
 4325 4330 4335
 Gly Gly Ala Pro Asp Val Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser
 4340 4345 4350
 30 Gly Ile Thr Gly Cys Val Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro
 4355 4360 4365
 Gly Ala Pro Pro Pro Gln Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala
 4370 4375 4380
 35 Gly Ala Asn Thr Arg Pro Cys Pro Ser
 4385 4390
 40
 <210> 2
 <211> 195
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe His Asp Asp Gly Phe Leu
 1 5 10 15
 50 Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser Leu Pro Glu Val Pro Glu
 20 25 30
 Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr Ala Ser Gly Leu Leu Leu
 55 35 40 45
 Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly Gln Gly Lys Asp Phe Ile
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val Phe Arg Tyr Gln Leu Gly
 65 70 75 80
 5 Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp Pro Ile Asn Asp Gly Glu
 85 90 95
 Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly Arg Arg Gly Ser Ile Gln
 100 105 110
 10 Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg Ser Pro Gly Pro Asn Val
 115 120 125
 Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ile Gly Gly Ala Pro Asp Val
 15 130 135 140
 Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser Gly Ile Thr Gly Cys Val
 145 150 155 160
 20 Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro Gly Ala Pro Pro Pro Gln
 165 170 175
 Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala Gly Ala Asn Thr Arg Pro
 180 185 190
 25 Cys Pro Ser
 195
 30 <210> 3
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 3
 Arg Thr Cys Arg Cys Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu
 1 5 10 15
 40 Cys Ala Asp Arg Ser Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys
 20 25 30
 Leu Lys Cys Phe Cys Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser
 35 40 45
 45 Trp Ser Arg Ala Gln Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe
 50 55 60
 Ser Leu Thr Asn Ala Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe
 50 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Pro Gly Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu
 85 90 95
 55 Ser Gly Pro Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys
 100 105 110
 Val Thr Ser Tyr Gly Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser

	115		120		125												
	Gln	Pro	Gly	Ser	Thr	Pro	Leu	His	Gly	Gln	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Gln	
	130						135					140					
5	Gly	Asn	Asn	Ile	Ile	Leu	Glu	His	His	Val	Ala	Gln	Glu	Pro	Ser	Pro	
	145					150					155					160	
	Gly	Gln	Pro	Ser	Thr	Phe	Ile	Val	Pro	Phe	Arg	Glu	Gln	Ala	Trp	Gln	
10					165					170					175		
	Arg	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Ala	Thr	Arg	Glu	His	Leu	Leu	Met	Ala	Leu	
				180					185					190			
15	Ala	Gly	Ile	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Arg	Ala	Ser	Tyr	Ala	Gln	Gln	Pro	
			195					200					205				
	Ala	Glu	Ser	Arg	Leu	Ser	Gly	Ile	Ser	Met	Asp	Val	Ala	Val	Pro	Glu	
20		210					215				220						
	Glu	Thr	Gly	Gln	Asp	Pro	Ala	Leu	Glu	Val	Glu	Gln	Cys	Ser	Cys	Pro	
	225					230					235					240	
	Pro	Gly	Tyr	Leu	Gly	Pro	Ser	Cys	Gln	Asp	Cys	Asp	Thr	Gly	Tyr	Thr	
25					245					250					255		
	Arg	Thr	Pro	Ser	Gly	Leu	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys	Glu	Arg	Cys	Ser	Cys	
				260					265					270			
30	His	Gly	His	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Pro	Glu	Thr	Gly	Ala	Cys	Gln	Gly	
			275					280					285				
	Cys	Gln	His	His	Thr	Glu	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Gln	Cys	Gln	Pro	Gly	
	290						295					300					
35	Tyr	Tyr	Gly	Asp	Ala	Gln	Arg	Gly	Thr	Pro	Gln	Asp	Cys	Gln	Leu	Cys	
	305					310					315				320		
	Pro	Cys	Tyr	Gly	Asp	Pro	Ala	Ala	Gly	Gln	Ala	Ala	Leu	Thr	Cys	Phe	
40					325					330					335		
	Leu	Asp	Thr	Asp	Gly	His	Pro	Thr	Cys	Asp	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	His	
				340					345					350			
45	Ser	Gly	Arg	His	Cys	Glu	Arg	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Pro	
			355					360					365				
	Ser	Gln	Gly	Gln	Pro	Cys	Gln	Arg	Asp	Ser	Gln	Val	Pro	Gly	Pro	Ile	
	370						375					380					
50	Gly	Cys	Asn	Cys	Asp	Pro	Gln	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Asp	Ala	
	385					390					395				400		
	Ala	Gly	Gln	Cys	Gln	Cys	Lys	Ala	Gln	Val	Glu	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	
55					405					410					415		
	His	Cys	Arg	Pro	His	His	Phe	His	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Pro	Asp	Gly	
				420					425					430			

Cys Leu Pro Cys Phe Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser
 435 440 445
 5 Ala Tyr Thr Arg His Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe
 450 455 460
 Gln Gly Phe Ala Leu Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly
 465 470 475 480
 10 Glu Phe Thr Val Glu Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly
 485 490 495
 Asn Phe Ala Gln Leu Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp
 15 500 505

 <210> 4
 20 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 25 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 25 30
 30 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 50 55 60
 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 40 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 85 90 95
 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 45 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 50 130 135 140
 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 55 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 165 170 175
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly

180 185 190
 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195
 5
 <210> 5
 <211> 199
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 15 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 20 25 30
 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 25 50 55 60
 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 30 85 90 95
 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 35 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 130 135 140
 40 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 45 165 170 175
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 180 185 190
 50 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195
 55 <210> 6
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 5 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 20 25 30
 10 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 35 40 45
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 50 55 60
 15 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr
 85 90 95
 20 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe
 100 105 110
 25 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr
 130 135 140
 30 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu
 145 150 155 160
 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys
 165 170 175
 35 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly
 180 185 190
 40 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu
 195

45 <210> 7
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 50 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp
 1 5 10 15
 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro
 20 25 30
 55 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp
 35 40 45

	Glu	Thr	Gly	Gln	Met	Ser	Ala	Thr	Ala	Lys	Gly	Arg	Val	Arg	Leu	Leu
	50						55					60				
5	Asn	Asn	Trp	Asp	Val	Cys	Ala	Asp	Met	Val	Gly	Thr	Phe	Thr	Asp	Thr
	65					70					75					80
	Glu	Asp	Pro	Ala	Lys	Phe	Lys	Met	Lys	Tyr	Trp	Gly	Val	Ala	Ser	Phe
					85					90					95	
10	Leu	Gln	Lys	Gly	Asn	Asp	Asp	His	Trp	Ile	Val	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asp
				100					105					110		
	Thr	Tyr	Ala	Val	Gln	Tyr	Ser	Cys	Arg	Leu	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Thr
			115					120					125			
15	Cys	Ala	Asp	Ser	Tyr	Ser	Phe	Val	Phe	Ser	Arg	Asp	Pro	Asn	Gly	Leu
	130						135					140				
20	Pro	Pro	Glu	Ala	Gln	Lys	Ile	Val	Arg	Gln	Arg	Gln	Glu	Glu	Leu	Cys
	145					150					155					160
	Leu	Ala	Arg	Gln	Tyr	Arg	Leu	Ile	Val	His	Asn	Gly	Tyr	Cys	Asp	Gly
					165					170					175	
25	Arg	Ser	Glu	Arg	Asn	Leu										
				180												
30	<210>	8														
	<211>	193														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
35	<400>	8														
	Met	Gln	Ser	Leu	Met	Gln	Ala	Pro	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu
	1				5					10					15	
40	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	His	Leu	Lys	Lys	Pro	Ser	Gln	Leu	Ser
				20					25					30		
	Ser	Phe	Ser	Trp	Asp	Asn	Cys	Asp	Glu	Gly	Lys	Asp	Pro	Ala	Val	Ile
			35					40					45			
45	Arg	Ser	Leu	Thr	Leu	Glu	Pro	Asp	Pro	Ile	Val	Val	Pro	Gly	Asn	Val
	50						55					60				
	Thr	Leu	Ser	Val	Val	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Leu
	65					70					75					80
50	Lys	Val	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Leu	Trp	Ile	Lys
					85					90					95	
	Ile	Pro	Cys	Thr	Asp	Tyr	Ile	Gly	Ser	Cys	Thr	Phe	Glu	His	Phe	Cys
				100					105					110		
55	Asp	Val	Leu	Asp	Met	Leu	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Cys	Pro	Glu	Pro
			115					120					125			

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 5 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 10 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 Ile
 15
 <210> 9
 20 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 25 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 30 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 40 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 45 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 55 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly

180 185 190

Ile

5

<210> 10
 <211> 178
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 15 Leu Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu
 1 5 10 15

Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val
 20 20 25 30

Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn
 25 35 40 45

Val Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro
 50 55 60

25 Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile
 65 70 75 80

Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe
 30 85 90 95

Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu
 100 105 110

35 Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly
 115 120 125

Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu
 130 135 140

40 Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys
 45 165 170 175

Gly Ile

50

<210> 11
 <211> 200
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Arg Ala Gly Pro Pro Phe Pro Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu

1 5 10 15
 Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Ala Pro Ala Gln Ala His Leu
 20 25 30
 5 Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu
 35 40 45
 10 Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro
 50 55 60
 Ile Ile Val Pro Gly Asn Val Thr Leu Ser Val Met Gly Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 15 Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu
 85 90 95
 Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser
 100 105 110
 20 Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr
 115 120 125
 25 Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His
 130 135 140
 Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val
 145 150 155 160
 30 Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg
 165 170 175
 Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys
 180 185 190
 35 Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile
 195 200
 40
 <210> 12
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 12
 Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Thr Pro
 1 5 10 15
 50 Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser Phe Ser Trp
 20 25 30
 Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg Ser Leu Thr
 35 40 45
 55 Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val Thr Leu Ser Val
 50 55 60

Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr
 5 85 90 95
 Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp
 100 105 110
 Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr
 10 115 120 125
 Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro
 130 135 140
 Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr
 15 145 150 155 160
 Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg
 20 165 170 175
 Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile
 180 185
 25
 <210> 13
 <211> 193
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 35 40 45
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 45 65 70 75 80
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 50 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 55 115 120 125
 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 5 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 10 Ile
 15
 <210> 14
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 14
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 25 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 30 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 35 65 70 75 80
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 40 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 45 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 50 145 150 155 160
 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 55 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 180 185 190
 Ile

5 <210> 15
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 15
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser
 15 20 25 30
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile
 35 40 45
 20 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val
 50 55 60
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu
 65 70 75 80
 25 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys
 85 90 95
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys
 30 100 105 110
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro
 115 120 125
 35 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 145 150 155 160
 40 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser
 165 170 175
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly
 45 180 185 190
 Ile

50
 <210> 16
 <211> 193
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu

	1		5		10		15									
	Leu	Ala	Thr	Pro	Ala	Gln	Ala	His	Leu	Lys	Lys	Pro	Ser	Gln	Leu	Ser
				20					25					30		
5	Ser	Phe	Ser	Trp	Asp	Asn	Cys	Asp	Glu	Gly	Lys	Asp	Pro	Ala	Val	Ile
			35					40					45			
	Arg	Ser	Leu	Thr	Leu	Glu	Pro	Asp	Pro	Ile	Val	Val	Pro	Gly	Asn	Val
10		50					55					60				
	Thr	Leu	Ser	Val	Val	Gly	Ser	Thr	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Leu
	65					70					75				80	
15	Lys	Val	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Gly	Leu	Trp	Ile	Lys
				85						90					95	
	Ile	Pro	Cys	Thr	Asp	Tyr	Ile	Gly	Ser	Cys	Thr	Phe	Glu	His	Phe	Cys
				100					105					110		
20	Asp	Val	Leu	Asp	Met	Leu	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Cys	Pro	Glu	Pro
			115					120					125			
	Leu	Arg	Thr	Tyr	Gly	Leu	Pro	Cys	His	Cys	Pro	Phe	Lys	Glu	Gly	Thr
25		130					135					140				
	Tyr	Ser	Leu	Pro	Lys	Ser	Glu	Phe	Val	Val	Pro	Asp	Leu	Glu	Leu	Pro
	145				150						155				160	
30	Ser	Trp	Leu	Thr	Thr	Gly	Asn	Tyr	Arg	Ile	Glu	Ser	Val	Leu	Ser	Ser
				165					170					175		
	Ser	Gly	Lys	Arg	Leu	Gly	Cys	Ile	Lys	Ile	Ala	Ala	Ser	Leu	Lys	Gly
			180					185						190		
35	Ile															
40																
	<210>	17														
	<211>	114														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
45																
	<400>	17														
	Met	Thr	Cys	Lys	Met	Ser	Gln	Leu	Glu	Arg	Asn	Ile	Glu	Thr	Ile	Ile
	1				5					10				15		
50	Asn	Thr	Phe	His	Gln	Tyr	Ser	Val	Lys	Leu	Gly	His	Pro	Asp	Thr	Leu
			20						25					30		
	Asn	Gln	Gly	Glu	Phe	Lys	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Asp	Leu	Gln	Asn	Phe
			35					40					45			
55	Leu	Lys	Lys	Glu	Asn	Lys	Asn	Glu	Lys	Val	Ile	Glu	His	Ile	Met	Glu
	50						55				60					

```

    Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu Phe Ile
      65                70                75                80

    Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met His Glu
5      85                90                95

    Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly
      100                105                110

10   Thr Pro

15   <210> 18
      <211> 93
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

20   <400> 18
    Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr
      1                5                10                15

25   His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp
      20                25                30

    Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys
      35                40                45

30   Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly
      50                55                60

    Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val
      65                70                75                80

35   Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu
      85                90

40   <210> 19
      <211> 92
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens

45   <400> 19
    Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
      1                5                10                15

50   Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
      20                25                30

    Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
      35                40                45

55   Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
      50                55                60

```

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80
 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 5 85 90
 <210> 20
 10 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 15 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15
 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 20 25 30
 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45
 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 25 50 55 60
 Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80
 30 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90
 35 <210> 21
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 21
 Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His Gln
 1 5 10 15
 Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu Leu
 45 20 25 30
 Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile Lys
 35 40 45
 50 Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn Gln
 50 55 60
 Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile Ala
 65 70 75 80
 55 Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

<210> 22
 <211> 93
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 22
 10 Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr
 1 5 10 15

 His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp
 20 25 30

 15 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys
 35 40 45

 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly
 50 55 60
 20 Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val
 65 70 75 80

 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu
 25 85 90

 30 <210> 23
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 23
 35 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His
 1 5 10 15

 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu
 20 25 30
 40 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile
 35 40 45

 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn
 45 50 55 60

 Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile
 65 70 75 80
 50 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu
 85 90

 55 <210> 24
 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile
 1 5 10 15
 5 Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu
 20 25 30
 10 His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile
 35 40 45
 Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met
 50 55 60
 15 Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly
 65 70 75 80
 Phe Cys Asp Glu Val
 85
 20
 <210> 25
 <211> 381
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 30 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 35 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45
 Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly
 50 55 60
 40 Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn
 65 70 75 80
 Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu
 85 90 95
 45 Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys
 100 105 110
 50 Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln
 115 120 125
 Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys
 130 135 140
 55 Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu
 145 150 155 160

Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu
 165 170 175
 Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His
 5 180 185 190
 Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys
 195 200 205
 10 Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys
 210 215 220
 Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu
 225 230 235 240
 15 Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile
 245 250 255
 20 Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg
 260 265 270
 Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro
 275 280 285
 25 Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser
 290 295 300
 Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala
 305 310 315 320
 30 Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys
 325 330 335
 35 Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg
 340 345 350
 Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr
 355 360 365
 40 Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 370 375 380
 45 <210> 26
 <211> 379
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 26
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 55 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys
 20 25 30
 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln
 35 40 45

	Cys	Arg	Ala	Leu	Gly	His	Cys	Leu	Gln	Glu	Val	Trp	Gly	His	Val	Gly	
	50						55					60					
5	Ala	Asp	Asp	Leu	Cys	Gln	Glu	Cys	Glu	Asp	Ile	Val	His	Ile	Leu	Asn	
	65					70					75					80	
	Lys	Met	Ala	Lys	Glu	Ala	Ile	Phe	Gln	Asp	Thr	Met	Arg	Lys	Phe	Leu	
					85					90					95		
10	Glu	Gln	Glu	Cys	Asn	Val	Leu	Pro	Leu	Lys	Leu	Leu	Met	Pro	Gln	Cys	
				100					105					110			
	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Asp	Tyr	Phe	Pro	Leu	Val	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	
15			115					120					125				
	Asn	Gln	Thr	Asp	Ser	Asn	Gly	Ile	Cys	Met	His	Leu	Gly	Cys	Lys	Ser	
	130						135					140					
20	Arg	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Gln	Glu	Pro	Gly	Met	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro	
	145					150					155					160	
	Lys	Pro	Leu	Arg	Asp	Pro	Leu	Pro	Asp	Pro	Leu	Leu	Asp	Lys	Leu	Val	
					165					170					175		
25	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	His	Thr	
				180					185					190			
	Gln	Asp	Leu	Ser	Glu	Gln	Gln	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Pro	Tyr	Cys	Trp	
30			195					200					205				
	Cys	Arg	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	Ile	Gln	Ala	Met	Ile	Pro	Lys	Gly	Ala	
	210						215					220					
35	Leu	Arg	Val	Ala	Val	Ala	Gln	Val	Cys	Arg	Val	Val	Pro	Leu	Val	Ala	
	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Ile	Cys	Gln	Cys	Leu	Ala	Glu	Arg	Tyr	Ser	Val	Ile	Leu	Leu	
					245					250					255		
40	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Pro	Gln	Leu	Val	Cys	Arg	Leu	Val	
				260					265					270			
	Leu	Arg	Cys	Ser	Met	Asp	Asp	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Thr	Gly	
45			275					280					285				
	Glu	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Ser	Glu	Cys	His	Leu	Cys	Met	Ser	Val	Thr	
	290						295					300					
50	Thr	Gln	Ala	Gly	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Ala	Ile	Pro	Gln	Ala	Met	Leu	
	305					310					315					320	
	Gln	Ala	Cys	Val	Gly	Ser	Trp	Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Cys	Lys	Gln	Phe	
					325					330					335		
55	Val	Glu	Gln	His	Thr	Pro	Gln	Leu	Leu	Thr	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Trp	
				340					345					350			

	Asp	Ala	His	Thr	Thr	Cys	Gln	Ala	Leu	Gly	Val	Cys	Gly	Thr	Met	Ser	
		355							360								365
5	Ser	Pro	Leu	Gln	Cys	Ile	His	Ser	Pro	Asp	Leu						
		370					375										
10	<210>	27															
	<211>	527															
	<212>	PRT															
	<213>	Homo sapiens															
15	<400>	27															
	Met	Tyr	Ala	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	
		1			5						10					15	
20	Gly	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Lys	Glu	Cys	Thr	Arg	Gly	Ser	Ala	Val	Trp	
				20					25					30			
	Cys	Gln	Asn	Val	Lys	Thr	Ala	Ser	Asp	Cys	Gly	Ala	Val	Lys	His	Cys	
			35					40					45				
25	Leu	Gln	Thr	Val	Trp	Asn	Lys	Pro	Thr	Val	Lys	Ser	Leu	Pro	Cys	Asp	
		50					55					60					
	Ile	Cys	Lys	Asp	Val	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Asp	Met	Leu	Lys	Asp	Asn	
		65				70					75					80	
30	Ala	Thr	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Val	Tyr	Leu	Glu	Lys	Thr	Cys	Asp	Trp	
					85					90					95		
35	Leu	Pro	Lys	Pro	Asn	Met	Ser	Ala	Ser	Cys	Lys	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	
				100					105					110			
	Tyr	Leu	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Ile	Lys	Gly	Glu	Met	Ser	Arg	Pro	
			115					120					125				
40	Gly	Glu	Val	Cys	Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys	Glu	Ser	Leu	Gln	Lys	His	
		130					135					140					
	Leu	Ala	Glu	Leu	Asn	His	Gln	Lys	Gln	Leu	Glu	Ser	Asn	Lys	Ile	Pro	
		145				150					155					160	
45	Glu	Leu	Asp	Met	Thr	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Met	Ala	Asn	Ile	Pro	
					165					170					175		
50	Leu	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Asp	Gly	Pro	Arg	Ser	Lys	Pro	Gln	Pro	Lys	
				180					185					190			
	Asp	Asn	Gly	Asp	Val	Cys	Gln	Asp	Cys	Ile	Gln	Met	Val	Thr	Asp	Ile	
			195					200					205				
55	Gln	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Glu	
		210					215					220					
	His	Val	Lys	Glu	Glu	Cys	Asp	Arg	Leu	Gly	Pro	Gly	Met	Ala	Asp	Ile	
		225				230					235					240	

[illegible]

<211> 523
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 28
 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

10 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp
 20 25 30

Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys
 35 40 45

15 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp
 50 55 60

Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn
 65 70 75 80

20 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp
 85 90 95

25 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser
 100 105 110

Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro
 115 120 125

30 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His Leu
 130 135 140

Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro Glu
 145 150 155 160

35 Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro Leu
 165 170 175

40 Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys Asp
 180 185 190

Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile Gln
 195 200 205

45 Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu His
 210 215 220

Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile Cys
 225 230 235 240

50 Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met Met
 245 250 255

His Met Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly Phe Cys Asp Glu
 260 265 270

55 Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala Lys Val Ala Ser
 275 280 285

Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro Ile Lys Lys His
 290 295 300
 5 Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu
 325 330 335
 10 Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu
 340 345 350
 15 Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu
 355 360 365
 Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu
 370 375 380
 20 His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr Val His Val Thr
 385 390 395 400
 Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val Gly
 405 410 415
 25 Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln Glu Ile Leu
 420 425 430
 Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro Tyr Gln Lys
 435 440 445
 Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu Ile
 450 455 460
 35 Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala
 465 470 475 480
 Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys Cys Ile Trp
 485 490 495
 40 Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala Gln Cys Asn
 500 505 510
 45 Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn
 515 520
 <210> 29
 50 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 55 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys

	20					25					30					
	Ala	Gln	Gly	Pro	Glu	Phe	Trp	Cys	Gln	Ser	Leu	Glu	Gln	Ala	Leu	Gln
			35					40					45			
5	Cys	Arg	Ala	Leu	Gly	His	Cys	Leu	Gln	Glu	Val	Trp	Gly	His	Val	Gly
		50					55					60				
10	Ala	Asp	Asp	Leu	Cys	Gln	Glu	Cys	Glu	Asp	Ile	Val	His	Ile	Leu	Asn
	65					70					75					80
	Lys	Met	Ala	Lys	Glu	Ala	Ile	Phe	Gln	Asp	Thr	Met	Arg	Lys	Phe	Leu
					85					90					95	
15	Glu	Gln	Glu	Cys	Asn	Val	Leu	Pro	Leu	Lys	Leu	Leu	Met	Pro	Gln	Cys
				100					105					110		
	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	Asp	Tyr	Phe	Pro	Leu	Val	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln
			115					120					125			
20	Asn	Gln	Thr	Asp	Ser	Asn	Gly	Ile	Cys	Met	His	Gly	Leu	Cys	Lys	Ser
			130				135					140				
25	Arg	Gln	Pro	Glu	Pro	Glu	Gln	Glu	Pro	Gly	Met	Ser	Asp	Pro	Leu	Pro
	145					150					155					160
	Lys	Pro	Leu	Arg	Asp	Pro	Leu	Pro	Asp	Pro	Leu	Leu	Asp	Lys	Leu	Val
				165					170						175	
30	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Pro	Gly	Pro	His	Thr
				180					185					190		
	Gln	Asp	Leu	Ser	Glu	Gln	Gln	Phe	Pro	Ile	Pro	Leu	Pro	Tyr	Cys	Trp
			195					200					205			
35	Leu	Cys	Arg	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	Ile	Gln	Ala	Met	Ile	Pro	Lys	Gly
		210					215					220				
40	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Ala	Gln	Val	Cys	Arg	Val	Val	Pro	Leu	Val
	225					230					235					240
	Ala	Gly	Gly	Ile	Cys	Gln	Cys	Leu	Ala	Glu	Arg	Tyr	Ser	Val	Ile	Leu
				245					250						255	
45	Leu	Asp	Thr	Leu	Leu	Gly	Arg	Met	Leu	Pro	Gln	Leu	Val	Cys	Arg	Leu
				260					265					270		
	Val	Leu	Arg	Cys	Ser	Met	Asp	Asp	Ser	Ala	Gly	Pro	Arg	Ser	Pro	Thr
			275					280					285			
50	Gly	Glu	Trp	Leu	Pro	Arg	Asp	Ser	Glu	Cys	His	Leu	Cys	Met	Ser	Val
		290					295					300				
55	Thr	Thr	Gln	Ala	Gly	Asn	Ser	Ser	Glu	Gln	Ala	Ile	Pro	Gln	Ala	Met
	305					310					315					320
	Leu	Gln	Ala	Cys	Val	Gly	Ser	Trp	Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Cys	Lys	Gln
				325					330						335	

Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly
 340 345 350

5 Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met
 355 360 365

Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu
 370 375 380

10

<210> 30
 <211> 4124
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 30

20 atgagagaat gggttctgct catgtccgtg ctgctctgtg gcctggctgg cccacacac 60
 ctgttccagc caagcctggg gctggacatg gccaaggtcc tcttggataa ctactgcttc 120
 ccggagaacc tgctgggcat gcaggaagcc atccagcagg ccatcaagag ccatgagatt 180
 ctgagcatct cagaccgcga gacgctggcc agtgtgctga cagccggggg gcagagctcc 240
 ctgaacgatc ctgcctgggt catctcctat gagccagca ccccgagcc tccccacaa 300
 gtcccagcac tcaccagcct ctcaagaagag gaactgcttg cctggctgca aaggggcctc 360
 25 cgccatgagg ttctggaggg taatgtgggc tacctgcggg tggacagcgt cccgggccag 420
 gaggtgctga gcatgatggg ggagttcctg gtggcccacg tgtgggggaa tctcatgggc 480
 acctccgcct tagtgctgga tctccggcac tgcacaggag gccaggtctc tggcattccc 540
 tacatcatct cctacctgca cccagggaac accatcctgc acgtggacac tatctacaac 600
 cgccccctcca acaccaccac ggagatctgg acctgcccc aggtcctggg agaaagggtac 660
 30 ggtgccgaca aggatgtggg ggtcctcacc agcagccaga ccaggggcgt ggccgaggac 720
 atcgcgacaca tccttaagca gatgcgcagg gccatcgtgg tggcgagcgt gactggggga 780
 ggggcccttg acctccggaa gctgaggata ggcgagtctg acttcttctt cacggtgccc 840
 gtgtccaggt ccctggggcc ccttgggtgga ggcagccaga cgtgggaggg cagcgggggtg 900
 ctgcccgtgt tggggactcc ggccgagcag gccttgaga aagccctggc catcctact 960
 35 ctgcgacgag cccttccagg ggtatccac tgcctccagg aggtcctgaa ggactactac 1020
 acgtggtggt accgtgtgcc caccctgctg cagcacttgg ccagcatgga cttctccacg 1080
 gtggtctccg aggaagatct ggtcaccaag ctcaatgccg gcctgcaggc tgcgtctgag 1140
 gatcccaggc tcctggtgag agccatcggg cccacagaaa ctcttctctg gcccgcgccc 1200
 gacgctgcag ccgaagactc accaggggtg gcccagagt tgcctgagga cgaggctatc 1260
 40 cggcaagcac tgggtggactc tgtgttccag gtgtcgggtg tgccaggcaa tgtgggctac 1320
 ctgcgcttcg atagttttgc tgacgcctcc gtcttgggtg tggtggcccc atatgtcctg 1380
 cgccaggtgt gggagccgct acaggacacg gagcacctca tcatggacct gcgccacaac 1440
 cctggagggc catcctctgc tgtgcccctg ctctgtcctt acttccaggg ccttgaggcc 1500
 ggccccgtgc acctcttcac cacctatgat cgccgcacca acatcacgca ggagcaactc 1560
 45 agccacatgg agtctcccggg cccacgctac agcaccacaac gtgggggtgta tctgctcacc 1620
 agccaccgca ccgccacggc cgcggaggag ttcgccttcc ttatgcagtc gctgggctgg 1680
 gccacactgg taggtgagat caccgcgggc aacctgctgc acaccgcac ggtgccgctg 1740
 ctggacacac ccgaaggcag cctcgcgctc accgtgccgg tcctcacctt catcgacaat 1800
 cacggcgagg cctggctggg tgggtggagt gtgcccgatg ccatcgtgct ggccgaggag 1860
 50 gccctggaca aagcccagga agtgctggag ttccacaaa gcctgggggc cttggtggag 1920
 ggcaacagggc acctgctgga ggcccactat gctcggccag aggtcgtggg gcagaccagt 1980
 gccctcctgc gggccaagct ggcccagggc gcctaccgca cagctgtgga cttggagtct 2040
 ctggcctctc agctcacagc agacctccag gaggtgtctg gggaccaccg cttgctagtg 2100
 ttccacagcc ctggcgagct ggtggttagag gaagcacccc caccaccccc tgctgtcccc 2160
 55 tctccagagg agctcaccta ccttattgag gccctgttca agacagaggt gctgcccggc 2220
 cagctggggt acctgcgttt tgacgccatg gctgaactgg agacagtga ggccgtgggg 2280
 ccacagctgg tgcggctggt atggcaacag ctggtggaca cggctgcgct ggtgatcgac 2340
 ctgcgctaca acctggcgag ctactccacg gccatcccgc tgctctgctc ctacttcttt 2400

gaggcagagc cccgccagca cctgtattct gtctttgaca gggccacctc aaaagtcacg 2460
 gaggtgtgga ccttgcccca ggtcgccggc cagcgctacg gctcacacaa ggacctctac 2520
 atcctgatga gccacaccag tggctctgcg gccgaggcct ttgcacacac catgcaggac 2580
 ctgcagcggg ccacggtcac tggggagccc acggccggag gcgcactctc tgtgggcatc 2640
 5 taccaggtgg gcagcagccc cttatatgca tccatgccc cccagatggc catgagtggc 2700
 accacaggca aggcctggga cctggctggg gtggagccc acatcactgt gcccatgagc 2760
 gaagcccttt ccatagccca ggacatagtg gctctgctg ccaaggtgcc cacggtgctg 2820
 cagacggccg ggaagctggg ggctgataac tatgcctctg ccgagctggg ggccaagatg 2880
 gccaccaaac tgagcggctc gcagagccgc tactccaggg tgacctcaga agtggcccta 2940
 10 gccgagatcc tgggggctga cctgcagatg ctctccggag acccacacct gaaggcagcc 3000
 catatccctg agaatgccaa ggaccgcatt cctggaattg tgcccatgca gatcccttcc 3060
 cctgaagtat ttgaagagct gatcaagttt tccttccaca ctaacgtgct tgaggacaac 3120
 attggctact tgaggtttga catgtttggg gacggtgagc tgctcaccca ggtctccagg 3180
 ctgctggtgg agcacatctg gaagaagatc atgcacacgg atgcatgat catcgacatg 3240
 15 aggttcaaca tcggtggccc cacatcctcc attcccatct tgtgctccta cttctttgat 3300
 gaaggccctc cagttctgct ggacaagatc tacagccggc ctgatgactc tgtcagtga 3360
 ctctggacac acgcccaggt tgtaggtgaa cgctatggct ccaagaagag catggtcatt 3420
 ctgaccagca gtgtgacggc cggcaccgcg gaggagtcca cctatatcat gaaggaggctg 3480
 ggccggggccc tggctcattgg ggaggtgacc agtgggggct gccagccacc acagacctac 3540
 20 cagtggtgat acaccaacct ctacctact atccccacgg ccggttctgt gggggcctcg 3600
 gatggcagct cctgggaagg ggtgggggtg acaccccatg tggttgctcc tgcagaagag 3660
 gctctcgcca gggccaagga gatgctccag cacaaccagc tgagggtgaa gcggagccca 3720
 ggctgcagg accacctgta gggaagggcc ccataggcag agccccaggg cagacagaac 3780
 ctctgggaca cacaccaagg gcactcctgc aggtggcccg gcctgaggtt cccaggagca 3840
 25 gcaaagggggc ctgctgagct ctggttaggt tacagctgga ggtgtgtata tatacacaca 3900
 cacacatgta tatacacata tatatgtgta tgtatatata tatggctttc 3960
 caataaccac ctaaatttta acaaaggttc cttctaagtg gtagaacttg ggggtggtatt 4020
 tttaccttcc ttcttcatac ttgtctcttt ttcttaaata ctcattaatg tgcatatatc 4080
 attattttca gatgcagcta tcattattcc aaaatacaaaa ataa 4124
 30

<210> 31

<211> 579

<212> ADN

35 <213> Homo sapiens

<400> 31

atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytn gnytnytnyt ngcnacnccn 60
 gcncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgygay 120
 40 garggnaarg aycncngcngt nathmgnwsn ytnacnytn arcncngaycc nathgtngtn 180
 ccnggnaayg tncnytnws ngtngtnggn wsnacnwsng tncnytnws nwsnccnytn 240
 aargtngayy tngtnytn ga raargargtn gcnggnytn ggathaarat hccntgyacn 300
 gaytayathg gnwsntgyac nttygarca y tnytn gayat gytnathccn 360
 acngngnarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tncntgyca ytgycntty 420
 45 aargarggna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygtng tncngayyt ngarytnccn 480
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaarmgn 540
 ytnngntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579

50 <210> 32

<211> 633

<212> ADN

<213> Homo sapiens

55 <400> 32

tttcttttgcg taaccaatac tgggaaggcat ttaaaggacc tctgcccgcct cagaccttgc 60
 agttaactcc gccctgacct acccttcccc atgcagtcct tgatgcaggc tccccctctg 120
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgacctct gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180

```

ccctcttttta agagtctgtt tgcagcctcc tggcccagct acgggtgtgc ggggtctggct 240
gagatatggg ggtggccact ccgttctcta gaattgggtc tctgcactag agccttccaa 300
agtaactaat tatgggattc tgggtctgtac aatgaggggtg gcctctaaag acttgttctg 360
ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctcctgccc tccctccaag 420
5 cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccaag agattcagtc 480
ctgttaaccc tgcaccttac tctgacccc cactccttat gtcccccatg ataaggcctg 540
ctgcctcatc tcttccccctg ctgcaatgcc ctgaggtctt cctgagagtt gggaggggtt 600
gagagctttc caaggccaag aggattcact aag 633

10
<210> 33
<211> 1047
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15
<400> 33
caggagcttg ccctcttgct gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcagggg 60
ggtgggaagt cagagaagggt gcccacccaa ggcctattag gtcagtctcc tgtttggaag 120
ttccagggtc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180
20 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccagggtc 240
ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctaccc aaggtcacac 300
tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttcttctt 360
tctccttctt tgctgcctga ttgtccccag ccacccagc tcagtagctt ttcctgggat 420
aactgtgatg aaggggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
25 atcgtcgttc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540
tctcctctga aggtgagcct ggggggtgggt ggagaagggg aggtgcgagg gtctggccag 600
caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
cagagaatag tacaggacat gtgattcag acactcttcc acaggttcat ggaatctcag 720
gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttcctgg tgagggcagg 780
30 agtgacggat accttgcacc tggcagaagc gtccctggcct tctctgggcc tgggtggccaa 840
ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatttgg ttttgctgtt aattataaaa 900
ttgatatacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
taaataaaat aggccaagtg tggtaacttc atgcctgtaa ttcccacacc cttaggaggc 1020
35 tgaagggtggg tgggatcctt tttgagg 1047

<210> 34
<211> 1706
<212> ADN
40 <213> Homo sapiens

<400> 34
acagtagatg ccagtgcatt tcaatgcaag tgttagagcc aatcaatggg tagtgactac 60
ctaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatgggtca cggcctgtaa tcccagcctt 120
45 tggaagggtga aggtgaaagg attgcttgag gccaggagtt ccagaccagc ttgggcaaca 180
aagttagccc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtggtggc atgtgcctgt 240
ctgtgtttcc cacctacatg ggaggctgag gcaggaggat cgtctgagcc caggagtttg 300
aggctgcagt gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaaa aaataaagaa ttctaagtct 360
atgtatagtt cagtgtaggg ggaaaattca catttgatta ttaatgtctg ccatgggcac 420
50 aataatacac tatactcaca catgggccac aatgttgcca ttcctagaac agactatctc 480
taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaaatata ttgctgcttt tttgaagaca 540
gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cctttgtttt 600
atthtttttt accaggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660
atcccatgca cagactacat tggcagctgt accttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720
55 atgttaattc ctactgggga gccctgcccga gagccctgc gtacctatgg gcttccttgc 780
cactgtccct tcaagaagt aagtacttag ggaggagaga gcgttaccct tgtggctaaa 840
gagatggggg ttggagagaa gggctcttgc attctccttc tgcagatctg catgtctctg 900
gatttgtaag ccagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960

```

```

    atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020
    ccatgctcta cagtgcctatg gccgtctctc atcttgtgcg gctgttttga gaatgggaag 1080
    aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct aggagaaaga ccccatcagt 1140
    aggcctccac tgactggcgg tccactggct ttcccgcagg gaacctactc actgcccagg 1200
5   agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg ccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260
    atagagagcg tcctgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgctgcctct 1320
    ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaagggtccc 1380
    ttttctctctg ttttgtgttt gccaggcca aactcccact ctctgcccc ctttaatccc 1440
    ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaatcattt tgtaccactt acattttagg 1500
10  ctggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagttcttga tagcccagg 1560
    catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcgtt 1620
    catttccaaa gcagttaagg aatgggaaca gagtgtttta ggacctgaag aatctttatg 1680
    actctctctc tttctctctt tttttt                                     1706

15  <210> 35
    <211> 633
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

20  <400> 35
    tttctttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
    agttaactcc gccctgaccc acccttcccc atgcagtcct tgatgcaggc tcccctcctg 120
    atcgccctgg gcttgcttct cgcgacccct gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180
25  cctcttttta agagtctgtt tgcagcctcc tggcccagct acgggtgtgc gggctctggct 240
    gagatatggg ggtggccact ccgttctcta gaattgggtc tctgcactag agccttccaa 300
    agtaactaat tatgggattc tggctctgtac aatgaggggt gcctctaaa agcttgttctg 360
    ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctcctgcc tccctccaag 420
    cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgccccaag agattcagtc 480
30  ctgttaaccc tgcaccttac tccctgaccc cactccttat gtcccccag ataaggcctg 540
    ctgcctcatc tcttcccctg ctgcaatgcc ctgaggtctt cctgagagtt gggaggggtt 600
    gagagcttcc caaggccaag aggattcact aag                                     633

35  <210> 36
    <211> 1047
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

40  <400> 36
    caggagcttg cctctcttgc gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcagggg 60
    ggtgggaagt cagagaaggt gccacccaaa ggcctattag gtcagtctcc tgtttggaag 120
    ttccagggtc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180
    ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccagggtc 240
45  atagggtatg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctaccc aagggtcacac 300
    tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttcttct 360
    tctccttctc tgctgcctga ttgtccccag ccatcccagc tcagtagctt ttccctgggat 420
    aactgtgatg aagggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
    atcgctgctt ctgggaaatgt gacctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540
50  tctcctctga aggtgagcct ggggggtgggt ggagaagggg aggtgagagg gtctggccag 600
    caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
    cagagaatag tacaggacat gtagattcag acactcttcc acaggttcat ggaatctcag 720
    gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttcctgg tgagggcagg 780
    agtgacggat acctgcacc tggcagaagc gtccctggcct tctctgggcc tgggtggccaa 840
55  ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatgttg ttttgcgtgt aattataaaa 900
    ttgatatacc aattagccag taatatatag tcaatttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
    taaataaaat agggcaagtg tggttaactc atgcctgtaa ttcccacacc cttaggaggc 1020
    tgaagggtggg tgggatcctt tttgagg                                     1047

```



```

<210> 37
<211> 1706
5 <212> ADN
  <213> Homo sapiens

<400> 37
10 acagtagatg ccagtgcat tcaatgcaag tgtagagcc aatcaatggg tagtgactac 60
   cttaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tcccagcctt 120
   tggaagggtga aggtgaaaagg attgcttgag gccaggagtt ccagaccagc ttgggcaaca 180
   aagtgagccc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtggtggc atgtgcctgt 240
   ctgtgtttcc cacctacatg ggaggctgag gcaggaggat cgtctgagcc caggagtttg 300
   aggctgcagt gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaaa aaataaagaa ttctaagtct 360
15 atgtatagtt cagtgtaggg ggaaaattca cttttgatta ttaatgtctg ccatgggcac 420
   aataatacac tatactcaca catgggccac aatgttgcca ttctagaac agactatctc 480
   taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaatata ttgctgcttt tttgaagaca 540
   gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cctttgtttt 600
   attttttttt accagggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660
20 atcccatgca cagactacat tggcagctgt acctttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720
   atgttaattc ctactgggga gccctgcccc gagccccctg gtacctatgg gcttccttgc 780
   cactgtccct tcaaagaagt aagtacttag ggaggagaga gcgttacctc tgtggctaaa 840
   gagatggggg ttggagagaa gggctcttgc attctccttc tgcagatctg catgtctctg 900
   gatttgtaa gacagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960
25 atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020
   ccatgctcta cagtgtctatg gccgtctctc atcttgtgag gctgttttga gaatgggaag 1080
   aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct aggagaaaga cccatcagt 1140
   aggcctcccac tgactggcgg tccactggct tccccaggg gaacctactc actgcccaag 1200
   agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260
30 atagagagcg tcctgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgctgcctct 1320
   ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaaggccc 1380
   ttttcctctg ttttgtgttt gccaaaggcca aactccact ctctgcccc ctttaatccc 1440
   ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaatcattt tgtaccactt acatttttag 1500
   ctggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagttcttga tagcccaggg 1560
35 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcggt 1620
   catttccaaa gcagttaagg aatgggaaca gagtgtttta ggacctgaag aatctttatg 1680
   actctctctc tttctctctt tttttt 1706

40 <210> 38
   <211> 1043
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

45 <400> 38
   tttcttttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
   agttaactcc gccctgaccc acccttcccc atgcagtcct tgatgcaggc tcccctcctg 120
   atcgccctgg gcttgcctct cgcgacccct gcgcaagccc acctgaaaa gccatcccag 180
   ctgactagct tttcctggga taactgtgat gaagggaagg accctgcggt gatcagaagc 240
50 ctgactctgg agcctgaccc catcgtcggt cctggaaatg tgaccctcag tgtcgtgggc 300
   agcaccagtg tcccctgag ttctcctctg aaggtggatt tagtttttga gaaggaggtg 360
   gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420
   ttctgtgatg tgcttgacat gttaatctct actggggagc cctgcccaga gcccctgcgt 480
   acctatgggc ttcttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gcccaagagc 540
55 gaattcggtt tgcttgacct ggagctgccc agttggctca ccaccgggaa ctaccgcata 600
   gagagcgtcc tgagcagcag tgggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgcctctcta 660
   aagggcataat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720
   tcctctgttt tgtgttttgc aaggccaaac tcccactctc tgccccctt taatcccctt 780

```

tctacagtga gtccactacc ctccactgaaa atcatttttgt accactttaca ttttaggctg 840
 gggcaagcag ccctgaccta agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcat 900
 ctgctgggct gaccacgtta ctcatccccg ttaacattct ctctaaagag cctcgttcat 960
 ttccaaagca gttaaggaat gggaacagag tgttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020
 5 ctctctcttt ctctctctttt ttt 1043

<210> 39

<211> 1047

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

caggagcttg ccctcttctgct gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcagggg 60
 15 ggtgggaagt cagagaaggt gccacccaaa ggcctattag gtcagtctcc tgtttggaag 120
 ttccaggtct atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180
 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccaggttc 240
 ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctaccc aaggctcacac 300
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc tttttcttct 360
 20 tctccttccct tgcctcctga ttgtcccccag ccaccccagc tcagttagctt ttccctgggat 420
 aactgtgatg aaggggaagga ccctgcgggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480
 atcgtcgttc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt ccccttgagt 540
 tctcctctga aggtgagcct ggggggtgggt ggagaagggg aggtgcgagg gtctggccag 600
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660
 25 cagagaatag tacaggacat gtagattcag acactctttc acagggttcat ggaatctcag 720
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttcctgg tgagggcagg 780
 agtgacggat acctgcacc tggcagaagc gtcctggcct tctctgggct tgggtggccaa 840
 ctgctcatta ttatctgaca gctctgggtg gccaatgttg ttttgctgtt aattataaaa 900
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960
 30 taaataaaat agggcaagtg tggtaacttc atgcctgtaa ttcccacacc cttaggaggc 1020
 tgaagggtggg tgggatcctt tttgagg 1047

<210> 40

35 <211> 1705

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 40

acagtagatg ccagtgattt caatgcaagt gttagagcca atcaatgggt agtgactacc 60
 40 taaagaattt taagactatg gattgagcat gatggctcac ggcctgtaat cccagccttt 120
 ggaaggtgaa ggtgaaagga ttgcttgagg ccaggagtgc cagaccagct tgggcaacaa 180
 agtgagcccc atctctacaa aaaatacaaaa attagctggg tgtggtggca tgtgcctgtc 240
 tgtgtttccc acctacatgg gaggtgagg caggaggatc gtctgagccc aggagtgtga 300
 45 ggctgcagtg agtgcagtga gccatgatac aaaaaaaaaa aataaagaat tctaagtcta 360
 tgtatagtgc agtgtagggg gaaaattcac atttgattat taatgtctgc catgggcaca 420
 ataatacact atactcacac atgggccaca atgttgccat tcctagaaca gactatctct 480
 aagatctcat ccagttaaaa attctatgat taaaatatat tgctgctttt ttgaagacag 540
 aagagctggg atgtttgccc tggaaattac acttataacc tttttcaaac ctttgtttta 600
 50 ttttttttta ccagggtgat ttagttttgg agaaggagggt ggctggcctc tggatcaaga 660
 tcccatgcac agactacatt ggcagctgta cctttgaaca cttctgtgat gtgcttgaca 720
 tgtaattcc tactggggag ccctgccag agcccctgcg tacctatggg ctcccttgcc 780
 actgtccctt caaagaagta agtacttagg gaggagagag cgttacccct gtggctaaag 840
 agatgggggt tggagagaag ggtccttgca ttctccttct gcagatctgc atgtctctgg 900
 55 atttgtaagc cagtgtgacc tatcaggaat cacttatctt cggggagcct cagttatcca 960
 tctacgaaat gggagacttg aacttagatg tgactctcag ggccctttat ccatataatc 1020
 catgctctac agtgctatgg ccgtctctca tctgtgtcgg ctgttttgag aatgggaaga 1080
 ggggtggtag ttcatggctg caatcctagc agtggctcta ggagaaagac cccatcagta 1140

```

ggctccact gactggcggt ccactggctt tcccgcaggg aacctactca ctgcccaga 1200
gcgaattcgt tgtgcctgac ctggagctgc ccagttggct caccacggg aactaccgca 1260
tagagagcgt cctgagcagc agtgggaagc gtctgggctg catcaagatc gctgcctctc 1320
taaagggcat atagcatggc atctgccaca gcagaatgga gcggtgtgag gaaggtccct 1380
5 tttcctctgt tttgtgtttg ccaaggccaa actccactc tctgcccccc tttaatcccc 1440
ttctacagt gagtcacta ccctcactga aaatcatttt gtaccactta catttttaggc 1500
tggggcaagc agccctgacc taaggagaa tgagttggac agttcttgat agcccagggc 1560
atctgctggg ctgaccacgt tactcatccc cgttaacatt ctctctaaag agcctcgttc 1620
atctccaaag cagttaagga atgggaacag agtgtttttag gacctgaaga atctttatga 1680
10 ctctctctct tctctctctt ttttt 1705

```

```

<210> 41
<211> 1043
15 <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 41
20 tttctttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
agttaactcc gccctgaccc acccttcccc atgcagtccc tgatgcaggc tcccctcctg 120
atcgccctgg gcttgcttct cgcgaccctc gcgcaagccc acctgaaaaa gccatcccag 180
ctcagtagct tttcctggga taactgtgat gaagggaagg accctgcggt gatcagaagc 240
ctgactctgg agcctgaccc catcgtcgtt cctggaaatg tgaccctcag tgtcgtgggc 300
agcaccagtg tccccctgag ttctcctctg aaggtggatt tagttttgga gaaggagggtg 360
25 gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420
ttctgtgatg tgcttgacat gttaattcct actggggagc cctgcccaga gccctgcgt 480
acctatgggc ttctttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gccaagagc 540
gaattcgttg tgcctgacct ggagctgccc agttggctca ccaccgggaa ctaccgcata 600
gagagcgtcc tgagcagcag tgggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgcctctcta 660
30 aagggcatat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720
tcctctgttt tgtgtttgcc aaggccaaac tcccactctc tgccccctt taatccccct 780
tctacagtga gtccactacc ctactgaaa atcattttgt accacttaca ttttaggctg 840
gggcaagcag ccctgacctc agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcat 900
ctgctgggct gaccacgtta ctcatcccc ttaacattct ctctaaagag cctcgttcat 960
35 ttccaaagca gttaaggaat gggaacagag tgtttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020
ctctctcttt ctctcttttt ttt 1043

```

```

<210> 42
40 <211> 342
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 42
45 atgacntgya aratgwsnca rytngarmgn aayathgara cnathathaa yacnttycay 60
cartaywsng tnaarytngg ncayccngay acnytnaayc arggngartt yaargarytn 120
gtnmgnaarg ayytncaraa yttyytnaar aargaraaya araaygaraa rgtnathgar 180
cayathatgg argayytnga yacnaaygcn gayaarcary tnwsnttyga rgarttyath 240
atgytnatgg cnmgnytnac ntgggcnwsn caygaraara tgcaygargg ngaygarggn 300
50 ccnggncayc aycayaarcc nggnytnngn garggnacnc cn 342

```

```

<210> 43
55 <211> 4195
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 43

```

	ttccaccttt	tggtctcttgt	aaataatgct	gctatgaaca	tgaatgtaca	aacatctgtt	60
	tgaatccctg	cattcaattc	ttttgcatat	ataccagga	gcagaatgat	ggatcatatg	120
	gtaattctgt	gtttatttat	ttgaggaaca	aacttgccgt	tttccataac	agctgcacta	180
	ttttacattc	ccactaacag	tgcattaggc	ttccaattct	ctatgccctc	accaacactt	240
5	gttttctggg	ttttaaaaga	agtagtagtc	atccttgtag	gtgtcagggtg	gtatctcatt	300
	gtcgttttgc	ttcatgtttt	cctaaagatt	agtaattttc	atatgcttat	tgaccatttg	360
	tatatcttct	tcggagaagt	gtctatttga	gtctttcccc	aatttttgatt	ggtttggttg	420
	ttttttgttg	ttgagttgta	gggattcttt	tatatcttgg	atattaatcc	cttatcagat	480
10	atgtgtttta	caaataattt	ctttgttaaca	acagaaacac	accacagtct	tcaagggttg	540
	aagccagtta	atctgagtag	cattttgtta	gtggtgggga	gaggatttgt	tcctcctgaa	600
	atcctgggga	attggccacc	tcctcttctc	ctcttaggca	tgaagcgcgt	ctggcttctc	660
	caaagaactc	ttccccctca	ctacctcaga	gttagcttcc	tctcttcagc	cagtgatcct	720
	gggttcccag	acacaataat	taaccaagag	aggggtgaaag	gctccctgct	gtgtttatgc	780
	aatggctcag	gcccttgtga	agtgcagagg	gaccccaagc	agcctccatc	ttccagggca	840
15	tggtccatcc	ccagctttca	cagaacagga	aagctgtgga	ggagtgtggg	cagcagggta	900
	ggaatggata	tagcccttgg	caacaacaca	tttccccaca	aagcaccac	ccaaaagaac	960
	aacaacgata	gttttagttt	ttagtaatga	gaacaatagt	tctcatgact	aaaagccatc	1020
	agccaggaca	ctgttctcaa	cccttttgcg	gtctttggac	cctttgaaac	tctgacagaa	1080
	gccattggagg	aatgttctca	ctgagtgcac	gcactcaaaa	tgatgcattc	aacttcaatt	1140
20	cagtttcagg	gatgtatggc	ctgaccacca	atgcagggga	ttagcaatcg	caatagtggg	1200
	gagggcatgg	gagtggggaat	ctggctggat	caagcaagtg	gatgccagca	gcccagaaaa	1260
	agagcccccc	tacctgcttt	ttccttctctg	ggcactattg	cccagcaaat	gccttctctc	1320
	ttccgcttct	cctacctccc	cacccaaaat	tttcattctg	cacagtgatt	gccacattca	1380
	ctggttgaga	aacagagact	gtagcaactc	tggcagggag	aagctgtctc	tgatggcctg	1440
25	aagctgtggg	cagctggcca	agcctaaccg	ctataaaaag	gagctgcctc	tcagccctgc	1500
	atgtctcttg	tcagctgtct	ttcagaagac	ctggtaagtg	ggactgtctg	ggttgccccc	1560
	gcacttttgg	cttctcttgg	ggagggtcag	ggaagtggag	cagccttctc	gagagaggag	1620
	agagaaaagc	cagggaggtc	tggagcaaaag	atactcctgg	aggtggggag	tgaggcaggg	1680
	ataaggaagg	agagtatcct	ccagcacctt	ccagtgggta	agggcacatt	gtctcctagg	1740
30	ctggactttt	cttgagcaga	gggtgggggtg	gtaaggaaag	tctacggggc	cccgtgtgtg	1800
	tgccatgtgc	tctgtgtgaa	tggacccttc	cccttcccac	acgtgtatcc	ctatcatccc	1860
	acccttccca	ccagaggcca	tagccatctg	ctggtttggg	tatttgagag	tgcaggccag	1920
	gacaaggcca	tcgcttgggg	catgaatcct	ctgcgtactg	ccctggccag	atgcaaatcc	1980
	cctgccattg	gattccccag	aaggttctgt	ttttcaggtg	gggcaagttc	cgtgggcatc	2040
35	atgttgaccg	agctggagaa	agccttgaac	tctatcatcg	acgtctacca	caagtactcc	2100
	ctgataaagg	ggaatttcca	tgccgtctac	agggatgacc	tgaagaaaatt	gctagagacc	2160
	gagtgtcctc	agtatatcag	ggtagaggag	ggctgggtgt	ggcgggggct	ctctgcctgg	2220
	tcctgggggt	gccctggggc	agcggtcctc	cctgccaccc	ttcatagatg	ctatgcctcg	2280
	gctctctctg	agatctttta	actctggctt	cttctctctc	aatcttgaca	gaaaaagggg	2340
40	gcagacgtct	ggttcaaaga	gttgatatac	aacactgatg	gtgcagttaa	cttccaggag	2400
	ttcctcattc	tggtgataaa	gatgggcgtg	gcagcccaca	aaaaaagcca	tgaagaaagc	2460
	cacaaaagag	agctgagtta	ctgggcccag	aggctgggcc	cctggacatg	tacctgcaga	2520
	ataataaagt	catcaatacc	tcatgcctct	ctcttatgct	tttgtggaat	gaggttcctc	2580
	ggtgtggagg	gaggggttga	aaacccaaag	gaagaaaaag	aaatctatgt	tatccccacc	2640
45	tacctctcac	aagcctttcc	tgctttaccc	ctcacctggc	ctctgcccc	cattccttca	2700
	gcccctcatt	tcgagcattg	gatttgaggc	ttaaggattc	aaaaagtcgt	catgaatata	2760
	gctgatgatt	ttatagtggg	tctgaaatgg	gtcggggatt	tgggaacagg	gtggtagtat	2820
	agaacaact	gatactgttc	tctaagctaa	atcttagctt	ccagctacct	gtcttagatg	2880
	tggtctcttg	gaacctttag	gtgatagcta	catagaagtg	tgtgggtgtg	tgtgtgtgtg	2940
50	tctgtgtgtg	tgtgtgtgag	agagagacag	acagaaaagag	agcaagagag	ggaagggggg	3000
	agaggctgat	tgtgtgtgtg	gtgtgatgta	ggtggacaat	gttcagagtc	ctccattaac	3060
	aggataatcc	tcacacctgt	ccacatacct	gtagtttgtc	cttggggatt	ttgaaaattt	3120
	ttcctccctc	tccactccca	aactcccaac	tcaattaaat	gataaaggaa	taggcaaata	3180
	ggaaaataaa	ttagtaaaaac	ttaagtcaaa	gaatagggtta	ttcatacgct	gcctatggga	3240
55	ttctatgctt	tgtgatcaga	aaattatcta	aaaaatactt	cccaagggct	ggtacaaggg	3300
	aggccagaag	acgagtgggt	cttctctgag	gtggacatta	aaaaaagaag	aaaatgaagg	3360
	ggaacccttt	gcagaagatg	tcaccccaaa	ctggattttc	atgtgtgggt	gtgggggaatt	3420
	ttctgttgtc	ctcacttagg	tgctggggca	gtggtgttag	tgatgggtaa	aaaggtagga	3480

agctgtcaca gaatcactaa accaggggttc ttaacttgtc tgtctataca tctctgaaat 3540
 tgggttgaag ttgtgtgcat cattttgagt gacgcactga gaacattcct ccacgggttc 3600
 catcgagagt ctcgaaaagg cccaacacct caaaaagggtt aagaacactt gtcctgctta 3660
 ctgggttttta gtaacaaatg gcagagtatt tctctctgtc tctctctctt tttttttttt 3720
 5 tttttttgag acacagggtc ttgtctgtca cgtggactag agtacaatgg gcatgatcat 3780
 gggctcactg tagcctcgaa cacctgggct caagttaatcc tcccacctca gcctcttttag 3840
 tagctgggac tacagcatga gccactgccc ttggctaatt tttaaattat tttttttag 3900
 agatggaaac ttgctatgtt gccaggcta gtctcaaact cctggactca agcgatcctc 3960
 ctaccttggc ctcccaaagt gctgagatta cagtgtgatc cacaccacac ctggccaaag 4020
 10 attggagtat ttttattgct attgttgtgc tgggtgggtg ggtgggtgta tgctttgtgg 4080
 ggacgtgtgt tgttgccaag ggctaaatca gttcctaccc tgctgcccac agtcctccac 4140
 agctttcctg ctctgtgaag ctaaggatag accccgatga taagctgtca acata 4195

15 <210> 44
 <211> 477
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 44
 tttttttttt ttttttttgg ataaagactt atttattatt tatcttatca tttcccagaa 60
 caaaggccat tgagtaagcc attcccttta aacttggttg ggcagctgtc acatggctga 120
 cctcttaatt acttcccaca gcctttgcca tgactgtggc catgcccacg tgggttggtc 180
 tcatgcagct tctcatgaca ggcaaaagatc aactttgcca tcagcatcat acactcctca 240
 25 aagctcagct gattgtcctg gtttgtgtcc aggtcctcca tgatgtcatt tatgagggct 300
 tcattttctt tctctttctt cataaaagggt tgccaaactg tgcttcccac catttggtct 360
 gaatttcctt ttgtcagggg tgtaggggng ggtcttcctt cttaaagtat tgatgaaagg 420
 gggccagatg ggggggttat gctgcgctcc atctgaaaag tggctttggt gggccat 477

30 <210> 45
 <211> 406
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

35 <400> 45
 tttttttttt tttttttttt ttttggagga agagacttta tttggcccca gcccttagcc 60
 ccacagccaa gacagtttga cataacaggc cccggggccc tgggttgggtg gaggcagggg 120
 ggcctggcct cctgattagt ggctgtggcc gtggccacca tgactgtggc cgtggccggg 180
 40 gccactgtga tcttggccac tgtggtctta gggggtgccc tcccagaggc ctggcttatg 240
 gtggtggcca gggccctcgt caccctcgtg cattttttcg tgggaggccc aggttagcct 300
 cgccatcagc atgatgaact cctggagctc agctgcttgt ctgcatttgg gtccaggtcc 360
 tccatgatgt gttctatgac cttttcattc ttattctcct tcttga 406

45 <210> 46
 <211> 425
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 46
 ggaggaagag actttatttg gccccagccc ctatccccac agccaagaca gtttgacata 60
 acaggccccc gggccctggt tgggttaaagg cagggtggcc tggcctcctg attagtggct 120
 gtggccgtgg ccaccatgac tgtggccgtg gccgtggcca ctgtgatctt ggccactgtg 180
 55 gtcttagggg gtgccctccc cgaggcctgg cttatgggtg tggccagggc cctcgtcacc 240
 ctcgtgcac ttctcgtggg agggccaggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcctc 300
 gaagctcagc tgcttgctcg catttggtgc caggtcctcc atgatgtgt ctatgacctt 360
 ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct tttcgacca gctcttngaa 420

ttccc

425

<210> 47

5 <211> 565

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 47

10 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcacccaga 120
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240
 agacaagcag ctgagcttcg aggagttcat catgctgatg gcgaggctaa cctgggcctc 300
 15 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420
 tcatggtggc caccggccaca ggccactaat caggaggcca ggccacccctg cctctacca 480
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttggct gtggggctag gggttggggc 540
 20 caaataaagt ctcttcctcc aagct 565

<210> 48

<211> 430

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 48

gacttggagg aagagacttt atttggcccc agcccctagc cccacagcca agacagttag 60
 acataacagg ccccgggggc ctgggtgggt agaggcaggg tggcctggcc tcctgattag 120
 30 tggctgtggc cgtggccacc atgactgtgg ccgtggccgt ggccactgtg atcttggcca 180
 ctgtggtctt agggggtgcc ctccccgagg cctggcttat ggtggtggcc agggccctcg 240
 tcaccctcgt gcatcttctc gtgggaggcc cagggttagcc tcgccatcag catgatgaac 300
 tcctcgaagc tcagctgctt gtctgcattt gtgtccaggt cctccatgat gtgttctatg 360
 accttttcat tcttattctc cttcttgaga aaattttgca gatcttttctg caccagctct 420
 35 ttgaattccc 430

<210> 49

<211> 305

40 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 49

tgacttggag gaaaaaactt tatttggccc cagcccctag cccacagcc aaaacagttag 60
 45 gacataacag gccccggggc cctggttggg tagaggcagg ggggcctggc ctcttgatta 120
 gtggctgtgg ccggggccac catgactgtg gccggggccg gggccactgt gatcttgcca 180
 ctggggtctt agggggtgcc ctccccgagg cctggtttat ggtggtggcc agggcccttg 240
 tcacccttgt gcattttttc gtgggaggcc cagggttagcc tcgccatcag catgatgaac 300
 50 tcttc 305

<210> 50

<211> 452

<212> ADN

55 <213> Homo sapiens

<400> 50

ggaggaagag actttatttg gccccagccc ctagcccccac agccaagaca gtttgacata 60

	acaggccccg	gggcccctggt	tgggtagagg	caggggtggcc	tggcctcctg	attagtggct	120
	gtggccgtgg	ccaccatgac	tgtggccgtg	gccgtggcca	ctgtgatctt	ggccactgtg	180
	gtcttagggg	gtgccctccc	cgaggccctgg	cttatgggtg	tggccagggc	cctcgtcacc	240
	ctcgtgcatt	ttctcgtggg	aggcccaggt	tagcctcgcc	atcagcatga	tgaactcctc	300
5	gaagctcagc	tgcttgctcg	catttgctgc	caggtccctc	atgatgtgtt	ctatgacctt	360
	ttcattctta	ttctccttct	tgagaaaatt	ttgcagatct	tttcgcacca	gctctttgaa	420
	ttccccctgg	ttcagggtgt	ctgggtgccc	ca			452
10	<210> 51						
	<211> 4439						
	<212> ADN						
	<213> Homo sapiens						
15	<400> 51						
	atcactgtgg	agtaggggaa	gggcactcct	ggggtggcaa	ggtgggaggt	gggcccctgtg	60
	ttcccacagt	gggcagggag	gtagtgaaag	ggaagctggc	cggacaggaa	gggccatttcc	120
	aagagggcct	tgtgcgagag	gctaagccaa	gctttctcca	taggcaatgg	ggagcaactg	180
	gaggttcgta	gcaggagaag	gacacatcaa	gccaccagg	aggctaagta	aaaacagttg	240
20	tctcccaagt	tataagttcc	tggaaacctt	gctgggagca	ggatttagaa	aaatgatgct	300
	gagagatgct	agaaacatat	tcgccctgag	gctctctcac	tcagactgca	agaggaaggt	360
	atcatcagaa	ttgcccttaa	ccaggaacca	gaatagctgg	gtcccccttcc	tgccaagtca	420
	gcaaccagct	atgtgacctt	gctcaggtcc	atctccgggt	gtcagtttct	tcatctacaa	480
	tgcaagaggg	ttgcccacct	ctgagaacct	ttctaaccct	aaatctcacc	ctatgaatct	540
25	aagaacacaa	cccctcgcca	tcctaagtat	cacagagcca	ggcaagcatg	ggtgagagct	600
	cagaccatcc	ttgttgact	aaaaggaagg	ggcagactgc	catggggggc	agccgagagg	660
	gtcaggcccc	cataggtcct	cagcctgctt	caacctcaaa	ggggatgggg	ggctgagtg	720
	tgccagagga	gcagcaggct	cgctcgggga	gagtagggcc	ttaggataga	agggaaatga	780
	actaaacaac	cagcttctctg	caaaccagtt	tcaggccagg	gctgggaatt	tcacaaaaaa	840
30	gcagaaggcg	ctctgtgaac	atttctctgc	ccgccccagc	ccccttctctg	gcagcattag	900
	cacactgctc	acctgtgaag	caatcttccg	gagacagggc	caaagggcaa	gtgccccagt	960
	caggagctgc	ctataaatgc	cgagcctgca	cagctctggc	aaacactctg	tgtggctcct	1020
	cggctttggt	aagttagctg	ccagcttccc	caggcagaag	cctgcctgcc	gattccttct	1080
	ttccttccct	gacccaactt	ccttccaaat	ccctctccta	gaagccctcc	ttggttggtc	1140
35	ctgcctactt	taaagcttct	ttcacatttt	cttaggtcat	gttccccctgg	ggcctcctgc	1200
	cctcaaatgc	tttgcttttt	ggcactctgt	agatattcta	aaaaatcatt	ttgtacatgt	1260
	gtgtgacagg	ccatctccca	gttaagttgc	agcctgtgct	ttctttttat	tttgacttct	1320
	ccccactatt	tctgtgagtg	cttagtagga	agtgtcaaa	aagcttgaca	gcattttctt	1380
	ctaagtgtcc	caactcttgg	ttttccatta	cacagacaga	gtgcaagacg	atgacttgca	1440
40	aaatgtcgca	gctggaacgc	aacatagaga	ccatcatcaa	caccttccac	caatactctg	1500
	tgaagctggg	gcaccagagc	accctgaacc	aggggggaatt	caaagagctg	gtgcgaaaag	1560
	atctgcacaaa	ttttctcaag	gtagggtcgg	actctggcag	gtctgaccca	gcctcaccgc	1620
	agtttgggtt	gacaagggag	gatgggagta	tgggctacag	caatcaaggg	gaagatttga	1680
	gctcctggag	cccagcccca	agacgcagcg	agtgtcctgt	tatacagggc	aggtgctcac	1740
45	agttacacag	gacgacaggg	tcaagaaatt	gctcaattga	acacctgcta	tttgtcgggc	1800
	cctgttctgg	gcagagggat	gtagtggtaa	atgggagccc	actattccat	gaggagacac	1860
	acagtaaaagt	tgttgcccaa	taaaagacac	agataaagcc	aaatgccaat	aagtgcctgg	1920
	aagaaaaatga	gataagatgc	gctgtgggca	atggggctgg	gtgggggtgga	ggtgaccagt	1980
	taggggtacat	gagaaggggc	tctt+gagga	ggtaacattt	gagctgagcc	ccgaatgttg	2040
50	gggaggggaag	cccctgagga	tgacacttgg	cacaaagctg	aggagaccct	aagcctcagg	2100
	gcgaacttgg	ggtggaagac	ttgggggctt	ttctaactct	aagggtctgc	ggtggaaaat	2160
	gaatgcataa	agagcacatg	gagagcacct	gcacagcact	caggggaactg	ggaggttttt	2220
	cccccgctcc	aaaaatgatt	aggcagttct	aagaaaaagg	ctgagcactt	ccaacagcct	2280
	ttttgttttc	ttttcaaatt	tggggaaaagt	cgggaaaacag	aggcctgcat	taagaaggggt	2340
55	ggaacacatg	ggtctcagtc	tcagttccag	tcccggagcc	agacatcctg	gggtaggtcc	2400
	ccagccctcc	cagtgcctcc	ccctccgctt	tggttaaggtg	gagaattgca	gccttcagag	2460
	ttagggggccc	tgacagctct	ccataggtgg	aggcctcagg	caggcaggat	gctgggtggg	2520
	gtaggcaaga	aaggggcccag	cagagaggcc	gcatacgaaa	actatcctcc	atgtgacccc	2580

ctatgcccgc ttcaccccc acctgacatc ccccaccaga agcaaagcga tgctgtggga 2640
 aaggaagcag agcctcatgg atgggctgca caggagagtg ctgcgattgg ctgggtaccc 2700
 cacaggttct gggaggggac ttagcgaggt gactcagtg ctcggcctcc caaagtgtg 2760
 ggattacaag catgagccac cctgtccgac catctccct tttatacttt atcacacct 2820
 5 tgaggtcagc ggagcacata ctctgctctc tgacctcca tctcccctgc ccacacctag 2880
 gtttttctag tgtttccccg ttgtattggg tgaaataagt ttcactaatt ggtaacctcc 2940
 agaggggaagg gaagggaggg caggggaagg agtgaagtgc agaggggtag cagagtggaa 3000
 ctggcctcta agtcagatct gaatttgcac gccctcaata gtcaagcctg tgaaaactaa 3060
 10 tgacctctc taggactggg ttcaagtctt cctccaggaa gataccattc ctactgttta 3120
 aagttgttat aaggaccaa tgaggtgaca tttccaggct tactcatgcc atgaccaggg 3180
 caagacctg gaactcagct tctcttcta taaatagaga atcagcacc aagtcacagg 3240
 gtcattggag gaataaactg gagagcggtt ggtatgtgct cagtgtctgc tccattgtgc 3300
 gcactcagcc tatggctcatt tttaattttt aaatccagcc ccagggtcga ggcttccttg 3360
 tacatttgcc agctggctcat ttactgtgct cccagctccc acctctggcc acaccagct 3420
 15 ctacagcct tctctcccca cccgcagaag gagaataaga atgaaaagg catagaacac 3480
 atcatggagg acctggacac aaatgcagac aagcagctga gcttcgagga gttcatcatg 3540
 ctgatggcga ggctaacctg ggctccccc gagaaagtgc acgaggggta cgagggccct 3600
 ggccaccacc ataagccagg cctcggggag ggcacccct aagaccacag tggccaagat 3660
 cacagtggcc acggccacgg ccacagtcac ggtggccacg gccacaggcc actaatcagg 3720
 20 agggcaggcc acctgcctc taccacaacca gggccccggg gctgttatgt caaactgtct 3780
 tggctgtggg gctaggggct ggggcaaata agtctcttcc tccaagtcag tgctctgtgt 3840
 gcttcttcca cctcttctcc aaccctgcct tcccagggt ctggcattta gacagccctg 3900
 tcttatctg tgactcagcc ccctcattca gtattaacaa aatgagaagc agcaaacat 3960
 gggctctgtg tgggccccct ggctcacctc cctgaccatg tctcacctc tgacttcagg 4020
 25 cccactgtt cagatcccag gctccctgcc ccactcaga caccctgtcc agcctgtcca 4080
 gcctgacaaa tggcccttgt cactgtacac tgtagaaagc aaaaaggcat atctctacc 4140
 cttgatatgc ctgctacctc accaaccagc cccaagcctg tcttcaccca tcactgtcta 4200
 cacagccctc tctctctcct aacagaattc tattcctctg aaagtcttca gaaactggac 4260
 ctagatagtg ccatgtctgg ggaggaatat ggcaccaggc agtggaaca aggacagatc 4320
 30 ggtgtgttat ctacatttg atcagagagc atgatctctc ttaacagacc tgccacccta 4380
 atcaacggga gtgctcacac aagtgggagt ctgagagctt agccctatgc ccaccctgg 4439

<210> 52
 35 <211> 565
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 40 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcaccaga 120
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240
 agacaagcag ctgagcttcg aggagtcat catgctgatg gcgaggctaa cctgggcctc 300
 45 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420
 tcatggtggc cacggccaca ggccactaat caggaggcca ggccaccctg cctctaccca 480
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttggtg gtggggctag gggctggggc 540
 50 caaataaagt ctcttcctcc aagct 565

<210> 53
 <211> 255
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

<400> 53
 गयायगगंग अयंतंतग्या रगयतग्याथ कारतगगना रंगयथथा रानगनगन 60


```

mgnacnaayw snacnttygt ncargcnytn gtngarcayg tnaargarga rtgygaymgn 120
ytnggnccng gnatggcnga yathtgyaar aaytayathw sncartayws ngarathgcn 180
athcaratga tgatgcayayt gcargaycar carccnaarg arathtgygc nytngtnggn 240
ttytgygayg argtn 255

```

5

```

<210> 54
<211> 2724
<212> ADN

```

```

10 <213> Homo sapiens

```

```

<400> 54

```

```

cgcgctatgt acgccctctt cctcctggcc agcctcctgg gcggcggtct agccgggccc 60
gtccttggac tgaaagaatg caccaggggg tcggcagtggt ggtgccagaa tgtgaagacg 120
15 gcgtccgact gcggggcagt gaagcactgc ctgcagaccg tttggaacaa gccaacagtg 180
aaatcccttc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctggtga tatgctgaag 240
gacaatgcca ctgaggagga gatccttggt tacttgagga agacctgtga ctggcttccg 300
aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgtcatcctg 360
gacatcatta aaggagaaat gagcgtcctt ggggaggtgt gctctgctct caacctctgc 420
20 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480
atcccagagc tggacatgac tgagggtggt gccccctca tggccaacat ccctctcctc 540
ctctaccctc aggacggccc ccgcagcaag cccagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600
caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggacca ctccaccttt 660
gtccaggcct tgggtggaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720
25 gacatatgca agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgcac 780
atgcaaccca aggagatctg tgcgtggtt gggttctgtg atgaggtgaa agagatgccc 840
atgcagactc tgggtccccc caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900
gtggagccca ttaagaagca cgagggtcca gcaaagtctg atgtttactg tgagggtgtg 960
30 gaattcctgg tgaaggaggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020
ctcgacgctt ttgacaaaat gtgctcgaag ctgccgaagt ccctgtcggg agagtgccag 1080
gaggtggttg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140
gagctggtgt gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200
cacgtgactc agccaaaagga cgggtggcttc tgccaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260
tgggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tcctggctgc tcttgagaaa 1320
35 ggtgcagctt cctgcccaga ccttaccag aagcagtggt atcagtttgt ggcagagtac 1380
gagcccgctg tgatcgagat cctgggtggg gtgattggat cttccttcgt gtgcttgaaa 1440
attggagcct gcccctcggc ccataagccc ttgttgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500
ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagcccagt gcaatgctgt cgagcattgc 1560
aaacgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620
40 gtttttttct acttgtgtgt ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680
aaaatagggc tccccacct cccccatttc tgtgtccttt attgtagcat tgctgtctgc 1740
aaggagagccc ctagcccctg gcagacatag ctgcttcagt gccccttttc tctctgctag 1800
atggatggtg atgcactgga ggtcttttag cctgcccctg catggcgccct gctggaggag 1860
45 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa cctcttggtt 1920
tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggcactg gtgggcctgg gcttctgagg 1980
tggcctcctg ccctgatcag ggacctccc cgctttcctg ggcctctcag ttgaaccaa 2040
gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcctttt 2100
aaatgatgta attcccactg taatagcata gggatttttg aagcagctgc tgggtggcctt 2160
ggacatcagt ggggccaagg gttctctgtc ctgtggttcaa ctgtgatttg gctttcccgt 2220
50 gtctttcctg gtgatgcctt gtttgggttt ctgtgggttt ggggtgggaa agggccatc 2280
tgctgaatg taacctgcta gctctccgaa gccctgcggg cctggcctgt gtgagcgtgt 2340
ggacagtggg ggcgcgctg tgctgtctgc tgttgacct atgtccctgg ctgttgaggc 2400
gctgtctcag cctgcacccc tccctttgtc tcatagatgc tccttttgac cttttcaaat 2460
aaatatggat ggcaagctcc taggcctctg cttcctggta gagggcggca tgccgaaggg 2520
55 tctgtctggg gtggattgga tgctggggtg tgggggttgg aagctgtctg tggcccaact 2580
gggcacccac gcttctgtcc acttctggtt gccaggagac agcaagcaaa gccagcagga 2640
catgaagtgt ctattaaatt gacttcgtga tttttgtttt gcactaaagt ttctgtgatt 2700
taacaataaa attctgttag ccag 2724

```

<210> 55
 <211> 2171
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 10 cgcgctatgt acgcccctctt cctcctggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccg 60
 gtccttggac tgaaagaatg caccaggggc tcggcagtgt ggtgccagaa tgtgaagacg 120
 gcgtccgact gcggggcagt gaagcactgc ctgcagaccg tttggaacaa gccaacagtg 180
 aaatcccttc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctggtga tatgctgaag 240
 gacaatgccca ctgaggagga gatccttgtt tacttggaga agacctgtga ctggcttccg 300
 aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgtcatcctg 360
 15 gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggaggtgt gctctgctct caacctctgc 420
 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480
 atcccagagc tggacatgac tgaggtggtg gcccccttca tggccaacat cctctcctc 540
 ctctacctc aggacggccc ccgcagcaag ccccgagcaa aggataatgg ggacgtttgc 600
 caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggaccaaa ctccaccttt 660
 20 gtccaggcct tgggtggaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720
 gacatatgca agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgcac 780
 atgcaaccca aggagatctg tgcgctggtt gggttctgtg atgaggtgaa agagatgccc 840
 atgcagactc tgggtccccgc caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900
 gtggagccca ttaagaagca cgaggtccca gcaaaagtctg atgtttactg tgaggtgtgt 960
 25 gaattcctgg tgaaggaggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020
 ctcgacgctt ttgacaaaaat gtgctcgaag ctgccgaagt ccctgtcggg agagtgccag 1080
 gaggtggtgg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140
 gagctggtgt gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200
 cacgtgactc agccaaagga cgggtggcttc tgccaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260
 30 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tcctggctgc tcttgagaaa 1320
 ggctgcagct tcctgccaga cccttaccag aagcagtgtg atcagtttgt ggcagagtac 1380
 gagcccgtgc tgatcgagat cctggtggag gtgatggatc cttccttcgt gtgcttgaaa 1440
 attggagcct gccctcggc ccataagccc ttgttgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500
 ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagcccagt gcaatgctgt cgagcattgc 1560
 35 aaacgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620
 gtttttttct acttgtgtgt ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680
 aaaatagggc tccccacct cccccatttc tgtgtccttt attgtagcat tgcgtctgc 1740
 aagggagccc ctagcccctg gcagacatag ctgcttcagt gccccctttc tctctgctag 1800
 atggatgttg atgactgga ggtcttttag cctgcccttg catggcgccct gctggaggag 1860
 40 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa ccctcttggg 1920
 tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggcactg gtgggcctgg gcttctgagg 1980
 tggcctcctg ccctgatcag ggaccctccc cgctttcctg ggccctctcag ttgaacaaa 2040
 gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcttttt 2100
 45 aatgatgta attcccactg taatagcata gggatttttg aagcagctgc tgggtggctt 2160
 ggacatcagt g 2171

<210> 56
 <211> 35465
 50 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 55 gatcttggct cactgcaacc tccgcctcca aggttcaagc gatcctccca cctcagcctc 60
 ccaagtagct gggattacaa gcgtgtgcta tcacacctgg ctaattttta tatttttggg 120
 agagatgggg ttctacttgg ttggttaggc ttgcttgtaa cctcagacct cagggtgact 180
 gcctgcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacaggtgtg agccaccgag cccagcctga 240
 ccccttcttt ctctactggc aaaactcctg ctccttttta aagccaagct catgtcacct 300

	cctctgtgaa	gtcctcgcgtg	actccccaag	cggtcagtg	ctctctcgta	tgggctcccc	360
	ggcccttgca	ctgctctcca	tcacacctg	accactctgg	gcagtggccc	ccctccccac	420
	ccactgacta	tgggctcctt	gaaggcaggg	cctgggtctg	ccccatctct	gtgtccccag	480
	caatgctggg	catgagtcag	cctcagaaga	catctgctga	atggctgcaa	accagaggaa	540
5	atatctccag	cctcaggctg	ggacccctcc	cctctctect	cccacctctg	acttcatacc	600
	actcaccctc	cagagtcttc	aatgcccact	attacttcac	acagttggcc	tgtgacaggc	660
	aatcagggtca	tcgtccacgg	ctaccagggtg	tttcatgtct	actgtgactt	ccaggaccac	720
	aagccctttt	gcgcccacca	tgtcttcacc	taagagatct	tcaaagccca	gtatgtctct	780
	ggcaccacag	ggatcctcca	tgcccactgc	ggatcccaag	cctcctgcct	ccttgaagtc	840
10	caccaaataca	gcaaacacca	acagatcctt	agtgccacc	aaaccagcga	catcccgtaa	900
	ctcagtcacg	agcccaagca	gttccaagtc	ccccaaatcg	accagtacaa	aaagagcccc	960
	ttctaaccgg	cccagcgaca	ggtcccgagt	cgcagcaaaa	gcaagaacac	ccagcagggt	1020
	gagcaccgac	accaggacca	gcaaagccag	caaggccagc	gacgtgagat	gccaccagcg	1080
	gaggggcaca	cacagccggg	gtaggacacc	tggcagaagg	ggaagccgca	gctccaagag	1140
15	gtcaccacag	agggccagca	ctcctggcag	gataagaact	catgggtgcc	gaccaggcat	1200
	ggccagcagg	gtgagaactc	ccacttcaca	gcaaaaaggg	agccggggaa	agagttacgg	1260
	ccggcctaga	accagcaaca	gggaaaggag	tgacagccag	cctagaaatc	tgagcaagaa	1320
	gagttaccgc	ccaccaggag	gctcaggtat	agggaggagt	tccgagctgg	ctgtaactcc	1380
	cagtcacgcc	aacgtctcaa	cccgaactgg	aattccctcc	aaggagaaga	gtgacaacct	1440
20	atctccatcc	tcataaagga	aggtgaagag	ctacggtcag	atgatcatcc	ccagtaggga	1500
	aaagagttac	agccccactg	aaatgtccag	cagggtcaag	agttataacc	agggcagcac	1560
	ccgcagcagg	ccgcaaagtc	acagccaatc	tagaagcccc	agaagggtcaa	gaagtggcag	1620
	tcagaagagg	acgcacagca	gagtgagaag	tcacagttgg	aagagaaacc	atagcagggc	1680
	aagaagtcgc	acccggaagg	gaattctgag	ccagatggga	agacacagcc	agtctagaag	1740
25	ccacagcaag	gggaaaagtc	aaaaccaatc	tgaaccccc	agaagaggaa	gaagtcacaa	1800
	ctgggtctaga	agccccagca	aggaaagaag	tcatagccat	tccagaagct	ccagcaagaa	1860
	gagagatcac	aggggatcta	gcagccccag	gaaggagagt	ggctgcagtc	aatcaggaag	1920
	ccccaaacaag	cagagagatc	acagccgatc	tagaagtccc	aacaaggcga	gagatcgag	1980
	ccgatctaga	agtccctaca	aggcgagaga	tcgcagccga	tctagaagtc	ccaacaaggc	2040
30	gagagattgc	agccgatcta	gaagtcccta	caaggcgaga	gatcgagcc	gatctagaag	2100
	tcccaacaag	gcaagagatc	atagccgatc	tagaagtccc	aacaaggcga	gagatcgag	2160
	ccgatctaga	agccccagca	aggaaagaga	tcacagccaa	cttggaagcc	ccagcaagaa	2220
	gagagatcac	agacgatcta	gaagccccag	caaggagaga	cagtgcagac	aatctagaag	2280
	ctccagcaaa	gagagagatc	acagacgatc	tagaagcccc	agcaaggaga	gacagcgag	2340
35	acaatctaga	agccccaaaca	aggagagaga	tcgcagccaa	tctagaagcc	ccagcgagga	2400
	gagagagcac	agacaatcca	gaagccccag	caaagagaga	gatcgagac	gatggagaag	2460
	ccccagcaag	gagagagagc	gcagacaatc	tagaagctcc	agcgaggaga	gagatcacag	2520
	ccgatctaga	agccccaaata	agcagagtgg	ttacagtcga	cctagagcct	ccagcaagga	2580
	gaaagctcat	agccgatcta	gaacccccag	caaagaagga	aatcatagcc	aatctagaac	2640
40	ctctagcaag	gagagcgacc	ccagtcaatc	tacagtcccc	agaagtcccg	actggaagag	2700
	atccccact	aggacaagca	gtctcagtc	gaatagaacc	cctagcaaga	caagcagcca	2760
	ctccccatca	acattttccca	gtggggggcca	aaccctaagc	caggatgaca	gtcaagccga	2820
	cgccaccacc	tctaaggcca	ccttacctgg	ggaaagggtct	tcatcatctt	cttccaagct	2880
	ggcgtagccc	ccagtctcag	ctggctcacg	ggtctctgtc	atgaccgggg	gaggggacag	2940
45	gagacaggag	cagagcagca	gctgagcagc	gtccctcccc	ggccagctct	ccacagccac	3000
	acctccggcc	acaagttctc	taatacacga	tgttggcagg	tagagaggga	tgctggatag	3060
	ggggaaagga	aagacctgtg	atgattcaat	aaatttttac	atagcaccca	tccccacca	3120
	gcccactgtg	gtgctcactg	ctggcatggg	gcacagagga	ccccagctct	gtccctgact	3180
	gtctacaggg	ctttgactgc	aagccctgcc	cctctctagg	tctttttttt	ttttgagaca	3240
50	gagtctctct	ctggtgcccc	ggctggagtg	cagtggtgtg	atctcagctc	actgcaacct	3300
	ccacctccca	ggctcaagca	attctcttac	ctcagcttcc	cgagttagctg	gaactacaag	3360
	tgtgcgtcct	cacgcccggc	taattttgta	tttttagtag	agatggggct	tcaccatgtt	3420
	ggccaggctg	ggctcgaact	cctgacctca	ggtgatccac	atgcctcaac	ctcgcaaggt	3480
	gtgtgggatta	taggcatgag	ccaccgcacc	cgtccccctc	tctaggtctt	aatttccgca	3540
55	tgtgtggcaac	aaggtcgcct	tctgtgtctt	attcagtggg	gtagggagag	gtgacactcc	3600
	aaatattcaa	cagtggtggc	tggtgtgggc	accaatcaga	actgagagtg	gagcgggacg	3660
	gataaccaggc	cttaacctct	tagttgtgtg	accatgggga	ggtctggggg	tgggggaagt	3720
	ttatgggggaa	aaaaaacctt	caaactgtgt	ttttctctca	ctctcacact	atcacaacaa	3780

	tcatcaacac	agaattctgt	gaccaaagt	gtggggcttt	ttccccacac	actacacagc	3840
	agacaacagc	taggtgtccc	ctccgattcc	attccaaagc	tgtccccaca	cccagctaata	3900
	ttttgtatatt	ttggaagaga	cagggtttca	ccatgttgcc	cagagctcaa	gcaatctgcc	3960
	cacttcagcc	ctccaaagt	ctgggattac	aggcgtgagc	caccacaccc	gactttttta	4020
5	aaaaaataaaa	aataaggccg	ggcgagtgga	cccatgcctg	taatcccagc	actttgggag	4080
	gccgaggtgg	gcagatcacc	tgagctcagg	agtttgacac	cagcctaggc	aacatggcaa	4140
	acttgtctct	aaaaaaaaaa	aaaaaattac	aaaagttagc	cggtgtgggtg	gcatgtgctt	4200
	atagtcaccag	ctacctgaga	ggctgaggca	ggaggataaa	ttgagcctgg	aagggtcaagg	4260
	ctgcagtgag	ccgtgacctt	gccactgcac	tcaagcctgg	atgacccatc	ttacaaaaaa	4320
10	aaaattttttg	ctggagctgc	tcacagaact	caaggaaatg	cttacttaga	tttactgggt	4380
	tattatagag	gatattgcaa	agaacaaaaga	tgaagagatg	tgtaggggcaa	gggtataagg	4440
	aagggggcagg	gagcttcacg	ccctccctgg	gggtgctacc	tacagggaacc	ctcaggtgggt	4500
	tagctatgcg	gaagctctcc	aaacccagtc	ctcttggtgt	tttacggagg	ctttaagaca	4560
	gcagcattgg	gcatggactt	ctctgaaaag	tgtcttaaga	ccaacaatca	agaaggtggg	4620
15	gaagattaga	gtcttgccct	ggggcaggaa	atggaggggca	ggaggagggtc	agagagattc	4680
	tgtttcttca	gacctgcccc	aggcctaagg	tacacaacat	tataacaaga	gactgtaaca	4740
	aaggctgtag	gagttaccag	ccaggaaactg	tggatgaaaa	ccaatatatt	tatatatata	4800
	ataccacaag	gggggtccaa	agtggcagtt	agggacaggg	agtacttggtg	tagcagtgac	4860
	acaccaaccc	atcttgaagt	attttaattat	ttaacaattt	ggtagggcta	tactagtgtt	4920
20	tgattatcag	ccttagttct	gtatcaattg	gcaagatagt	gtctagggtt	gccacactct	4980
	agctgtgtag	caccaagcaa	agaacttaac	ttctctagcc	tgtttctctc	tctggaagaa	5040
	aggggcttcc	aggccttaac	tcacgtactc	cccataacta	gactgggaat	tatctccttt	5100
	gtacagatga	ggaaacagac	acagaggtga	taagttagta	gcccagggtc	accatctggt	5160
	aagtggatga	actaggattg	gaagccagac	ctttcataaa	atgatttctc	agctcaaaag	5220
25	gtttttctga	agattcagta	ggctcactga	tagaaaattgc	tggtgtgtgg	ctggatttcc	5280
	atcaagagt	gcccattacta	ctcccacccc	tgcccctcta	taaactccag	atgttccaga	5340
	cctctcatct	ctccctgtgc	acacaaggcc	ttttcacatc	tgtgggtctt	agtacacca	5400
	ctgttgctgt	caagaatgtc	ctcctcctcc	tttttttttt	tttttttgag	atggagtctc	5460
	actttgttgc	ccaggctgga	gtacagtagc	gcatctcag	ctcactgcaa	cctctaccct	5520
30	gcatcagcct	ccctagtagc	tggtgattaca	ggcagccacc	accaccatgc	ccggctaatt	5580
	ttttgggtatt	tttagtagag	acagggtttc	attatgtcag	ccaggctggt	ctcaaactcc	5640
	tgacctcagg	tgatccattt	accttggcct	cccagagtg	tggtgattaca	ggcaagagcc	5700
	accacgcccc	gcccctcttc	cccctttttg	gcccggagaa	ctccttttca	cccttcaaag	5760
	cccaccacaa	acataagaac	ctctataactt	cttgcccgt	gaaatactgc	ctctgccagg	5820
35	aagccttctg	tgacttctct	ctctccctct	tcaccaacgg	accgcccccg	ccccccacca	5880
	accccaccac	acacacacac	cactactgtc	ttccactgta	ctccctgaca	gtagagaacc	5940
	aagcagggcc	agttgatgca	gcctcagcta	tatctcttac	atgccaaggc	ccatgcactg	6000
	gggatacaat	gggtgaaaat	acatgggtcc	ttcaaagtct	ggatgtcaag	tttaatgctg	6060
	gggactaaag	agaaaagctt	cagattgaaa	cctggagggtg	gctggggcaa	aggaccattg	6120
40	gcatcattgg	cagggcaact	tcctaaagaa	agcacctaaa	tcttggtttt	taaagacaga	6180
	tttcataaatt	ggcagaggag	aattctaattg	ataccctatt	gcctacaggg	cccatcttaa	6240
	tttggaatt	ctactttata	ccaagataag	attgccagat	ttagcaaata	aaaacagaag	6300
	acatccaatt	aattttttttg	tttggtttttg	gggtttttgtt	gcggagatgg	tgtctcacta	6360
	tggtgcaag	gctgctgtca	aattcctggc	tcaaacaatc	ctcctgcctt	ggcctcccac	6420
45	ttcccaaagt	gctgggatta	caggcatgag	ctaccacacc	tggcccttat	ttattttattt	6480
	atttaattttt	ctttttttggg	acggagtgtc	actctgtcgc	ccagggttga	gcgcagtagc	6540
	gcgatctcgg	ctcactgcaa	cctctgctc	cagggttcaa	gcgattatcc	tgccccagcc	6600
	tcccaagttag	ctgggactac	aggcgcgtgc	ctggatgccc	ggctttttttt	ttttttttttt	6660
	ttttttttttt	gagacggagt	cttgctctgt	cgcccaggct	ggagtgcagt	ggcacgatct	6720
50	cggtcactg	caagctccgc	ctcctgggtt	cacgccattc	tcctgcctca	gccttccgag	6780
	tagctgggac	tacaggcgcc	tgccaccacg	cccactatt	ttttgtatatt	ttagtagaga	6840
	tggtgggtttca	ccgtgttagc	caggatgatc	tcgatctcct	gacctcgtga	tccaccgcgc	6900
	tcggcctccc	aaagtgtctg	gattacaggc	gtgagccacc	gcgcccagcc	tacttatatta	6960
	tatttttttaa	gagacaggg	ctcgctcagt	tgcccaggct	ggagtgcagt	agggtgatct	7020
55	gtaggaaaag	ggcttccagg	ccttaactca	tgtactcccc	cataaccagg	ttgggaggtt	7080
	agctcactgt	aacctcaaac	tcctgtctc	aaggtaccct	actagccctt	aggagagcag	7140
	ctgggactac	aggtatgcgc	caccatgcc	ggcttaattt	ttactttttt	ttttttttttt	7200
	ttttttttgta	gagacggggg	tctcactata	ttgcccaggc	tggtcttgaa	ctcctggtct	7260

	caagcgatcc	tcctgcctta	gcctcccaaa	gtattggtat	caactgcaact	agcccaaaga	7320
	attaatatag	ctatgttcca	tgtgatattt	gggacatact	tttctaaaag	gttgtatctt	7380
	ttggatataa	ttgtttatct	gaaattcaaa	tttaactaga	cattgtatat	tttatacggc	7440
	aaccacacac	ctgggacaat	caagacattc	cctgaagtta	ccaggagaca	atgcccatac	7500
5	gcctacactt	ttccaaagccc	acgtcacaca	aggccccttc	cagagtattc	cagacgtcag	7560
	gtagggccat	cccttggttc	acaagtccca	ctcctaccac	gcctatggca	gccaaactga	7620
	aaggcaaaac	cagtgtctga	gaccccacaa	tgccctgggc	ctatagcagt	caattcccaa	7680
	gatgccccgc	gtgaacacaa	taggcacccg	ttccaatgct	cgagcaaaaga	gaccagggca	7740
	aaaccttcca	ctacgggaca	ataacggcca	gttcccacaa	ttcgtttgtg	cagttcttcc	7800
10	caggatgcct	taggcctata	gcgaccacct	tcccagactc	cccgtgtgga	agcgtctcaa	7860
	gcctccagga	cggctcagcg	caggtgtggg	ataaaaaggaa	ccggtctcga	caaggatctg	7920
	ggacactctt	tcccaggatg	caccaggcct	acgactagcg	gaccgactcc	cacagcgctt	7980
	caaggcggag	cgctcggttc	tcccaggatg	ccccagggcg	gcacaaaacgc	gtagggggag	8040
	aaaaagaagc	cctcgggtca	ccacggcccc	agaccggccg	ctccccgggtg	acgggagtcg	8100
15	tcgctcccat	catgcagcgg	ggcgttagcg	cccgttccc	ggcatgcctc	gcgcacccct	8160
	gcccgggaca	ctcaccggcg	ccggcgggccc	ccgctccggc	tctgcggcgg	cggtctgcac	8220
	cccagcctct	gcgcctgcgt	cgcaagtagg	gtaggacagc	gcgcaggggg	cgtgaagagc	8280
	ctagggcgct	tgcgcggcga	gacggactag	tctgttagcg	ctgtgggaag	aggggctatg	8340
	cgcgtcgggc	cgtcgacgag	acccgcgcgg	ggggcgccgt	gctttgcccc	tcgctgcctg	8400
20	ggtttacttg	gtacagcccg	cggcccaaaag	gaacaagaag	ctgaagggtt	cgcgcgtgcg	8460
	tgtgcggggc	aggaacgcgc	cttacaacaa	tgggatgcgc	tgggggtgga	gggcgctagt	8520
	tcggactgga	tcctggggccc	gaggcctgct	tatttgcata	atcctagcgc	gggacaatga	8580
	aaggcctccc	gcactggaag	gagtgatttg	catattcccc	ggaggggccc	tactccagag	8640
	cgcagtgatt	agcatatggc	gggggcaacc	tgagcaaagc	gcctgcgcgc	agggactgca	8700
25	gactgacgcg	aagtgggtag	ccttgtcttc	gtaggggatc	agtttgcatc	ctgagagagg	8760
	gcacgagggc	caggacccct	cccaaccagg	ataaagggtt	attgatctcc	taggtgtcag	8820
	gccccatgct	ggcggattct	gtggtttctg	cagtgaacca	tactcctgta	ctcacggcac	8880
	cccagtcgaa	ggagatacgc	acctaattag	acaactacta	cccagaaggc	cagacctgga	8940
	gtgaggaaca	cagggggctg	tgggagccta	agaggcgctt	gccccggcct	ctggttctag	9000
30	aaagacttcc	aggaggtggt	gatccttaag	ccaagtacga	ataggagcca	actagaatgg	9060
	gaatgggtct	ggcagaatga	actgcaagcg	ccaaggccca	gaggccaaaa	aaaaaaaaaa	9120
	aaaaatagaa	gcgcagtgtt	tgattgagga	agcaagagca	gcttagtatg	cctagaacct	9180
	aactgagagc	gggaatatgt	tctatagacg	atggttagagt	tcaactatgg	ctacattcca	9240
	gtcttctctg	aagtgacttt	gtcacattct	ggcttaaaac	tccccaaaag	ggatccatt	9300
35	aggaaaaaaa	aaaaatccaa	aaatctttat	catggcctca	gggctataca	cctggctctg	9360
	cogtgccttat	ctttctgacc	ccacctactt	cctcctccct	ccatttctgt	ccagctccac	9420
	cttaccocaa	actctttacc	agctcggggc	tctgctcttg	ccgttccctc	cgctgaaaa	9480
	tgtctttccc	tctgaccttt	gaatacctac	tcttgtgctc	accattcata	tcttggta	9540
	gatgtcaatc	tgagaggctt	ttcctgatct	ctccataata	gcacttacac	atttgactgg	9600
40	agttatggat	aaatcgggat	tggccatgag	ttggtgggtg	ttgtaactgg	catgaagagt	9660
	acatggggct	gggcgcgggtg	gctcacgccc	gtaatcccag	cactttggga	ggccgaggct	9720
	ggtgtatcac	ctgagggtcag	gagcttgaga	ccagcctggg	caacatgggtg	aaaccctgcc	9780
	tctattaaaa	ctacaaaaat	tagccagggg	ttatgggggg	tgctgtaat	ccttgctact	9840
	tgggaggctg	aggcacgaag	atcacttgaa	ccctggaggc	agagggttgca	ttgagtcgag	9900
45	attgagccac	tgcactccag	cctggggccac	ccagcgagac	tctgggtctc	gcctgtaatc	9960
	ccagcacttt	gggaggccga	ggcggggcga	tcacgtcaga	agatcgagac	catcctggcc	10020
	atcctagacc	atcttctacta	aaaatacaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaattag	ccgggcgttg	10080
	tggcaggcgc	ctgtagtccc	agctactcgg	gaggctgagg	caggagaatg	gcgtgaacac	10140
	gggaggcgga	gcttgcagtg	atccgagatg	gcgctactgc	actccagcct	gggcgacaga	10200
50	gcgagacttg	gtctcaaaaa	aaagagtaca	tgggacgtta	ttgtcctgtc	tactcctgtg	10260
	ggtttgaagt	tttccataat	gacaatggca	taccacatca	ccatactctg	catttatatt	10320
	aatagttctt	atcacaaatc	gaactttctt	tgcttccttg	ttttgagtg	tttccctcat	10380
	aaagcttcat	gagggttaaga	atggagtcgc	cctttttcac	tttgggttct	caatgcttag	10440
	agcaggatca	gatttcagat	tagtgtagcg	ctgtcttta	cacttaacat	ttgctgtttt	10500
55	tattcaccat	ggactctaga	acttttagca	gcacctggca	catcgtaaga	ggttattttt	10560
	taaagttaga	ataatacatc	taaaatgtac	atgaatgaat	gagaggcctg	ggatgccaga	10620
	ctaaagagct	ttgacttggg	ctaaaggtga	tggggagcta	ggcaaagggt	ttgagagttt	10680
	aactttaatt	caaagttccc	ttggagacta	atgtctgggg	tagggggaag	ccagggttaag	10740

	gggtccggggcc	atggaatggg	gtagctcagt	cgctatcaaa	aagacaagac	tgtgactatt	10800
	tggctgaaga	aatggccaaa	cccagggttc	tggggagggtc	gagggtacct	cagtggaggtc	10860
	aggaccttct	cctggcctat	actgtccacc	agcaaccatc	acactcctcc	ctccccctcc	10920
	ccttagttcc	cctcccaatg	gtacagccct	tgacagcagg	acagacacac	agccacccca	10980
5	aacacttggt	ctctcctcag	tttaatgggtg	gttagtgaga	ttgccaaaacc	ccctcccat	11040
	tccccccccc	accccgtaga	aaatgtgtgt	gtgggtttttt	gtttttttgtt	ttttgttttt	11100
	taacaagaaa	aagggggcaa	aagccaggaa	tggggagagg	ggggtgcaat	ctgatatttt	11160
	catacagact	tttgattttt	taatataatta	tatataaaac	catgaagacc	acgaatcctc	11220
	cccaaactcc	tttccccctc	cccggggggc	ctggaggaga	gatggggaag	gccccccag	11280
10	gagtgggtgg	acagagagac	aaatatggat	gggacagacg	ttgggggaga	aggtagagag	11340
	aaggggagcc	caggaacctg	gggaaggggg	attggagaaa	aggggtgggg	ctgtctccct	11400
	actgcccccc	atcaaagtta	tgacacaaag	acacagaatc	cctattttcca	cgccctcccc	11460
	ccaccatcc	ccccaccgtg	caaacatggc	tttgcaaaaga	agtgcccgaga	gctctgtgga	11520
	actcttaca	tggctggcat	ggggtctagg	acccccaaag	aaatctgtgt	tccccctccc	11580
15	tgcccccccc	acccttccca	gaaactgacc	ccctccccac	aagacctggt	tttgtagcct	11640
	aggggcccctg	gccttcccccc	agttatcttc	ccccaaccca	atccctactg	ccctcactgg	11700
	acttggggggg	tctggacctt	tggccccctgc	ccccctggggg	accagacctt	ctggggccctc	11760
	acttcttgcc	cttacagaga	tccaggcatc	caacaccccc	atccctgccc	aagcgtctga	11820
	ggtgttagtg	gtgggggggag	aagcccacca	tcccagactc	tggtaaattgt	ctttgtctggt	11880
20	tccctgcagc	tggcagtggtg	ggggacccca	gcccaggccc	aggcctaggc	ctgggggtggg	11940
	gatagggtca	gatgaagaat	tccctctttcc	tcttgtgtcc	gtcgtgcca	ttgaggaagg	12000
	cttctcttgc	ttctccctgt	tcatccaagc	cactggcttc	gtgggtcaga	taggaacctg	12060
	aggggggtgac	agaccccccg	ggcagggggg	acatatttgt	ggatccagga	gttggacaga	12120
	agtataagg	aagagggaga	cagacaagac	acatgccagg	cgaagggaaga	gggagaaacg	12180
25	gaacacacag	ggagaggcag	agaaagaggt	aaacagtggc	agagaaagag	gtaaaagcag	12240
	aattaggaag	actccaaaag	ctaccgaaa	gtgccacct	tatcctttct	cttggaggta	12300
	tttcccttgc	ctgctccccg	cgaattcagc	aattaggaaa	ataaattgtt	ttattcaa	12360
	ccatgctctt	tttttccccct	aatTTTTTgt	atttttagta	gaaaaggggc	tgcgccatgg	12420
	tgcccaggct	ggtctcgacc	tcttagcttc	tcaagtgtt	tatccgcctt	ggcctcccaa	12480
30	cgtgctggga	ttacaggcgt	gagccaccgc	gcccaccgc	aaatctatgc	ttttaattca	12540
	gcttctaaat	tctaccctt	ttcgagtatt	gtgccgaaag	ccccgcccc	tttgtcatct	12600
	ccgcccccg	tgcgggcgga	tttggaaatcc	agagcctagg	ctccgcccct	tcgttacctt	12660
	ggctcttaggc	cccgcctctt	tccgagcct	acaaccaacc	aaccgtagag	tccaggcccc	12720
	gtcccactca	cctctctgcc	gtaccgagca	ccagaccatg	cccactagca	cacatatgat	12780
35	cagaaaacacc	agcagcgcca	ggatgccgcc	cacaatggca	tagggaaccg	acgtctgagc	12840
	ctctaccacc	gcaccagggt	ctgccagagg	gacacggcac	aggaccaggt	catcagagga	12900
	cgatcccagt	ctggccccat	cgctgccaa	cttttaagcc	attctgcaca	cgtctaaccg	12960
	tgccctttta	tgtgccacac	ccctcaaaaa	ttactgccac	cttgtagtct	cttctctttc	13020
	cagatgcttg	ttggtttgta	cactgcccga	ccccctccct	gagtcatgtt	acattttcct	13080
40	tttctttttc	ttggtttctt	ttgcagagac	gggggtctca	ctatgtggcc	caggctgatc	13140
	ttaaactcct	gggctcaagc	gatcctccgg	cctaggccctc	ccaaagtact	gggattagag	13200
	gcgtgagcga	ccgcaccag	ccatcccttt	tcttttgact	caagtctctt	cctccactaa	13260
	gaaacagagt	ccaagaaaca	ggtccaagtc	ccttcccacc	ttgtctaaaa	cgctccaagt	13320
	atTTaaagt	ctgggcccac	ctaccaa	ttctgcccc	ccgtcataga	gctaaacaca	13380
45	gaacagctgt	gtgctagagc	ccattccaac	caccttacat	atTTagtTca	cataatcttc	13440
	acaacagcct	tgttatatag	gtgctattgt	ttatttccac	tttactgatg	ggtaaaactga	13500
	ggcgagaca	ggttcgggtta	cctgcaatag	aatgcagcca	acccgaattt	gagcccccg	13560
	ggccagtctg	gtcccaaaac	aaaaagaact	ctggttggtg	ccgaaccctt	gagttatgtg	13620
	gcctctttgc	tcaagccccg	ccccgcacc	ctggcgcccc	gccccgccc	tcagtcggcc	13680
50	gcagcctgct	ctcaccgtag	accacaagta	cgtagagcgc	cctcgcatgg	ccgtgcttat	13740
	tggacgcctc	gcaagtgtag	gtgccgttat	ccgcggtatc	cagaccgggc	agcgtgagcg	13800
	tctctccac	ggcctccgcc	ctctccggca	aagactcatt	cccgcggttc	cagcggtatc	13860
	ggtttggcct	gggtggggat	aaagtatagt	gagagttagg	aaccgagggtg	ccagcaccac	13920
	attctgactt	gtcaagaatc	tagacatgca	actctcatcc	cgaggggacc	tccaaataag	13980
55	aggttgcctg	ctatctcttt	cctttctgga	aaaccaacag	tcctgggcct	acttccaccc	14040
	atcaccaagg	tctagccag	gctgaacatg	gtggccttatg	gtggccttatg	cctgcaatcc	14100
	cagcacttta	ggaggctgag	acgggaggac	tgcttaaggc	cagcagttcc	agaccagcct	14160
	gggcaacaca	gggagacccc	gtcactacaa	ttaaaaata	ataataataa	taataataat	14220

	tctagccctc	ccacgccatt	ccatcctcag	caaccaggag	tctgaggctg	cacagcttca	14280
	gtattgggga	gtctgagcct	ccagattcct	cctccctcag	gatccaggag	tccagggtccc	14340
	agatccctat	togtccagg	ccccagctct	ctcctcctca	ggacccagga	atccagggtcc	14400
	tagctccctg	tttgtccagg	tcctcagctc	tctcctcctt	aggacccagg	agtccaagtc	14460
5	cctgggtccct	gttcttccag	gtccccagct	ttctcctcct	gaggacgcag	gaggccccc	14520
	gagctcacct	gggggtcccc	gtgacagcac	acgtcaacac	cagcgtgtct	ccctcctcct	14580
	ccacagcttg	ggaggcatga	atccggggccg	tgggggagtc	tgtaggcaa	aagtaagagg	14640
	agagagtagt	ttccaagcca	tcacgcagga	caagggggac	cctcgcgggt	gcgggtgggt	14700
	ggcgttggga	tcccttgggt	cctggcccgc	cggtcactta	cactgcacat	ccagcacgta	14760
10	ctgcgtctgc	ttgctgtgtc	cggagggcag	cgcctggttc	tgccctcac	agatgatgat	14820
	accaccgtcg	tccttacggg	ccacacgaaa	ccgtactgtg	cttgccacgc	tccagacctt	14880
	gccattttcc	tggtgtgtgc	tcactcctgc	cacaccccg	tcagacactg	tcaggccaca	14940
	attccggctc	catccacca	cccacccgag	ccaacgcaa	agcaggctat	ttgccaagct	15000
	ccacccctta	cccacaggcc	ccgctcttg	tcctccaagc	tacgcccctc	ccctaaccac	15060
15	gcccacgtgc	ctcctcccaa	agctcttccc	tctttcacgc	tcattgctttc	tcgtctatca	15120
	atccatttaa	ttgctatata	tataaaaaa	tataattata	tataacttta	gagacagggt	15180
	ctcacaatgt	tgggcagggt	gaactcctga	cctcaagcaa	tcctcccctc	tcagcctccc	15240
	aaagtgtctg	gactacaggc	gtgagccacc	gcgctcgaca	tcaaccacta	catattgaat	15300
	gtccagtgtc	tgtgaaaacc	tgtggctcct	ctccacatat	aaacaacctc	tcctaaggctc	15360
20	cacctcctcc	ccatcccttg	tcagcactcg	gcccagggtg	cctttcagct	ccttgccgtc	15420
	ccggtaccag	cgcagggtgg	cagccggacg	ggaccgcgga	acgaggcagc	tgagctccac	15480
	ctcgcgcgcc	tctaccgcct	gctcccggac	ctccaccaca	ggattctctg	gggccactgc	15540
	cgcagggaga	aggaagtaa	gggggttaag	aaggcacgaa	cgtgggtcga	aagcgatcga	15600
	gctgcctgtt	cccagcgacc	atagggaaac	aggggtcccag	gtggcagggg	tcaaagggga	15660
25	gaggtcagga	gccagatgcc	catccaggat	gttaaaaata	gccatggtct	gaaagtctca	15720
	ggagaagaga	gaagcagaga	agaaaggagg	agaggatgcg	tctgacaagg	gggagggcgt	15780
	tacctagtac	cgtgagcgtg	gcaatctggt	gggtgggtgtc	ttctgtgtag	agctggcaga	15840
	aatagccccc	ctcgtcctcc	aggcgggcat	ctgagagccg	gatccgcacc	cggcgtgggg	15900
	agaactcctc	aagctggaaa	cgctcatcct	tcaaggctag	agagagttag	ggggaagggtg	15960
30	tgaatttcgg	gagtcctggc	ctcacaagtc	ccacccttcc	gacaggagct	tagagtccag	16020
	ccctctgcct	cttttctcca	gccatatcta	tgagtctgag	gtgtccaact	atttactccc	16080
	ttgaggaccc	agcattatct	aagtctcctc	gcctgcagga	ccagcagctc	gggacccag	16140
	ccctttcttc	tccgagaccc	aggagacctt	gtgtcctctt	tcaggagcgt	tcaggagcgt	16200
	ggagcctggg	ccccagccct	ctcttctctt	aagactcctg	agtctgggtc	ccagcactca	16260
35	ccacgggtgc	cattgaagaa	gagggctctgc	cgggctgggt	tctggatgac	aactatggac	16320
	ccatcatact	ggtgcagacg	gcagggtgatc	tcagccaccc	caccctcagc	cactgtcacg	16380
	ttctctgtct	gtacttctctg	tcctgcccct	ggacgattag	acaaagagac	aggatagaag	16440
	acttactgag	agctgcaatt	caattttttt	tttctccctc	ttccccatcc	aaacctccaa	16500
	tcctctctct	tcctctcatt	cattccattg	cactgaacat	ttcctgcagg	ctagagtcca	16560
40	ggacaggag	gaaatctgct	ccctactcta	aaagagctgc	agtcaagatt	tagtagaata	16620
	tgctctaattg	agggcagcac	agggcacact	aggagcccag	agcaaggagg	gactattata	16680
	gaattgccta	gagagatggg	tagccagaga	gggctctgca	agaaagctcc	attggatctg	16740
	gatcttaaa	agtaagcagg	aggctgagcg	cgggtggctca	tgctgtaat	cccagcactt	16800
	tgagaggccg	agggtgggcg	atcgcaagg	caagagatag	agaccatcct	ggccaacatg	16860
45	gtgaaaccct	gtcactacta	aaaatacaaa	aaaaaaaaaa	aaattagctg	ggtgtgggtg	16920
	tgcgcacctg	tagtcccagc	tactcgggag	gctgaggcag	gggaatcgct	tgaacccggg	16980
	agttggaagt	tcagtgagc	cgagatggag	ccactgcact	ccaggctggg	cgacagagcg	17040
	agactctgtc	tcaaaaaaaaa	aaagaaagaa	aaaaaagagt	aagcaggagt	tcacaagggtg	17100
	tgggagactg	ctgtgtgttc	accaagcctc	atctttcaca	cctgggacac	tggtgttagcc	17160
50	cgtttgcaaa	gatagccgta	atattctcct	gtccctggac	atgccctttg	caagttgatt	17220
	ttgccattcc	tcccattgag	aaggcacttt	gtccctact	agtctgggta	agccttgaga	17280
	gttgctttga	ccaatagaat	ttgctagaag	tgatattgag	cctaggcctg	aagaggcctt	17340
	gtagcttcca	ctcctgccct	aagactgttg	catgaagata	cccagactag	tgtctttgca	17400
	gatgaacaat	catggtgaaa	gagaagccca	gccggcagcc	agcaccaatc	gccagctgtg	17460
55	tgagtgtggc	catcctggat	catccagccc	cagctgcccc	accagctgac	agcagccaca	17520
	caagtgaccc	cagttgagac	caataaaaga	tctgccatc	tgatacagcc	caaactgctg	17580
	aacccagaa	tcatagaaca	ataaggtggt	ggtgtgttta	agctcctaag	ttgtgggtga	17640
	tctgttctac	tgctaaagtt	aactgatata	atacataatt	aggctatact	tcccagcatc	17700

	ctttatagtt	agggtggggcc	atgtgaccaa	ttctggccaa	tgggatgtag	gtggaagaga	17760
	aacacctctt	gcagcctgac	ccatctccct	cataatcctt	cacactggct	gaacagagag	17820
	gactccaagg	agcctagagg	agggcagaat	cacaagccag	aaggaacctg	ggtctctaac	17880
	tgactgtccc	ccatgacctg	cctgtatagg	actgtgatat	gagcaagaaa	tatacctttt	17940
5	tggttaagcca	ttgagatttc	aggggtgtct	gttacagcct	ttaacctacc	ctgattaatc	18000
	catcagaaaa	acaagggtgg	gaatctagaa	ccatcagaga	aaagcattta	ggaaagctga	18060
	aagccaagac	taatcatcag	cattaatatc	atcatctgtt	gtcttcaaaa	taacaataac	18120
	ccccatagct	accaattatt	aggctacttg	agtgttagtc	cctgtgctaa	gggcattacc	18180
	catataactt	acctttaatc	ctcacaatcc	ctgtgtaagg	tagacatgat	tattatcatt	18240
10	attattatta	ttttgggaca	gagtattgct	ctgttgccca	ggctggagtg	cagtgggtgtg	18300
	atctcagctc	attgaaacct	ccacctccca	agttcaagcg	attcttcagc	ctcagcctcc	18360
	caagtagctg	gaattacagg	catgcaccac	catgcggggc	taattttttat	ttttagtaga	18420
	gacagagttt	agccatattg	gcctggctgg	tctcgaactc	ctggcctcaa	gtgatccgcc	18480
	tgccctcagcc	tcccaaagtc	cagggattac	aggtgcgacc	caccgcgcct	ggccaattat	18540
15	tattattatt	tttaatttga	gacaagggtca	ggctggagtg	cagtggcacg	atctcagctc	18600
	actgcaatgt	ctgcctccca	ggctcgagtg	atcccacctc	agcctcccca	gtagctggaa	18660
	ctacaggtgc	acaacatcac	acctggctaa	cttttgtatt	tttttagaga	cggagtttca	18720
	ccgtgttgcc	caggctggct	ttgaacttgc	gagctcaagt	gaactgcctg	cttcggcctc	18780
	ccaaagtgtc	gggattacag	gcatgagcca	ctgtgcccgg	cctgcgctat	tattatcccc	18840
20	attttgcctg	gcctgcgcta	ctattatccc	cattttcccc	catttccatt	tttcttttct	18900
	tttttttttt	tttttttttt	tgagacattg	tcttgctctg	tcgcccaggc	tagagtgcag	18960
	tggtacgata	tcggctcact	gcaacctcca	cttcccgggt	tcaagcaatt	ctcctgcctc	19020
	agcctcccaa	gtagctggga	ttataggcac	ctgccactgc	acttggttaa	tctttgtgtt	19080
	tttagtaaa	acgggggtctc	accatcttgg	ccaggtcggg	ctggaactcc	tgacctcgtg	19140
25	atccaccgcc	ctcggcctcc	caaagtgtctg	ggattacagg	cttgagctat	cgtgtcctgc	19200
	tcccattccc	atttttatagg	tgagaaaatt	ggcccacaga	gatgaaatga	cttgcccaa	19260
	ttcacagcca	agagtggcag	tgccaaaatc	ttcgtccaaa	tctctgattc	tgtatcctga	19320
	atctgtatat	ccactcctgg	ctgtctggat	taagtgtcca	tcattggcag	ggggtttgtga	19380
	gagccgcttg	tgatgggcct	cgaatgccaa	cctaggagat	ttgctttcat	cctaagggcc	19440
30	agtgaagggt	ttgaagcagg	aatatgccat	gattagatct	ggctatttgt	ctttaagtgc	19500
	tggataacta	tccatgtctt	ttacattcag	gtgctgggtt	gcattcattc	aggagtattt	19560
	cctgagcatc	acgtagggtt	tcaggggctg	agtagtcaga	gatgagttag	atgaggtccc	19620
	tgccctttaa	gattttatgg	aaggtaggaa	ccaatcacgg	taatcaaaa	tgttatgtgg	19680
	ctgggcacgg	tggtctcacac	ctgtaatccc	agcactttgg	gaggccgagg	tgggcggatc	19740
35	acaaggctcag	gagttcgaga	ccagcctgac	caacatgggtg	aaaccccgctc	tgtactaaaa	19800
	atacaaaaat	tagccagggtg	tgggtgggtgg	tgcttgtaat	tccagctact	caggaggctg	19860
	aggcataaga	atcgcttgaa	cctgggaggc	agagggttga	gtgagccaag	atcgcgccac	19920
	tgacgtccag	cctgggtgac	agagcaagac	tccgtttcaa	aaaagaaaaa	aaaaaaagaa	19980
	ataaataaaa	gaaagtgtta	tgttttctgt	aagagggtag	gtaacctaat	ttggaagttg	20040
40	aggggtagaa	aagattattt	ctgggggatg	gagacagaga	cttctggctt	cctattcttg	20100
	catccatttt	tccctttctc	ctcagtaaaa	gaaaagaaca	ctggttgtat	tttatggttg	20160
	cactatgtcc	agcagaaaaa	ggcattcctc	agtctccttg	cagcaaggta	aagccatctg	20220
	ataaaatttt	gtccagttgg	atataagcca	aaatgttgcg	tgacaatttt	gggaggactt	20280
	cctgaaacag	gtggacaaac	cctttttcta	ctgagtcacc	tttgtgccac	ctggaactaa	20340
45	cagtgtgacg	cgtggaattt	aggcagccat	attgaaccat	gaggacaaga	gcagtgggga	20400
	tggcggaacc	aagagctgga	agggtgcctga	gtctctgggtg	aagatgtgga	gctgctgtaa	20460
	cagccctcaa	ctcctagttc	tggacttctt	ttatgtttta	gtgtaacgct	ttgggtattt	20520
	ttattttttt	aatttttttt	agagatgagg	tctcactatg	ttgcctaggc	tggactcaaa	20580
	ctcttatgct	caagcagctc	tctgcctca	gcttcatgag	tagctgaaac	tatagcactt	20640
50	tgggtatttc	agccactgtt	tgagggtttt	ctagcacctc	ctggaatatc	aagcttaaca	20700
	tgtccaatcc	ttgccccaga	tatttttctc	cccaaatttt	ctcaatctca	ataaatgtca	20760
	ccaccatcca	cctgggttgc	cagggtcaaaa	acctagaaat	cattcaagtt	ctctcccttt	20820
	ccctcatccc	caatatccat	tccatcagca	acatctgtcc	attctacctc	caagacatat	20880
	cccagatctc	atcacctttg	tctgcctctc	ctaccctcac	tctcatccag	catcatccct	20940
55	cacctggact	ctgcaaaaagc	ctactcgtgg	gtctgtctgc	atccctgtct	gcctcctcca	21000
	gggccattct	ccaccagtg	gccggatcga	tttttcaaag	aggtaaatca	gatcaattca	21060
	cctttctgct	taaaaccttc	cgagggtgc	ccgtaacatg	tagaataaaa	tagagacccc	21120
	ttcccgggga	cttcaagggtg	ctatatggcc	tggccccttg	ctgaccttac	ttcactctgg	21180

	gctcgctagc	cttgctgtcc	ctcaaacatg	ctgagctcgc	tcccaccaca	gggccttttc	21240
	ccttttcttc	cttctgacctg	gaatgttctt	ctccccacct	cccaagcccc	atcttcccag	21300
	ggctgactcc	tgttcccatt	tgggtctcaa	atcatatcag	taccttctca	gagaggcctt	21360
	ccctcactgc	tcattcccttc	accttttagaa	cacttttctt	tcttttaaga	gacaaagtca	21420
5	gcccagtgcg	gtggctcacg	cctgtaatac	cagcactttt	gagaggccaa	ggcgggcaga	21480
	tcacctcagg	tcaggagtcc	aagaccagcc	tggccaacgt	ggcgaaaccc	cgtctctact	21540
	aaaaaaatac	aaaaattagc	taggcagtgg	tagcccgggc	tactcaggag	gctgaggcag	21600
	aattgcttga	accaggagg	cagaggttgc	agtgagccga	gattgagcca	ctgcacccca	21660
	acctgggtga	cagagagaga	ctctgtctca	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaag	agacagggtg	21720
10	ttgtctctgc	accaggctg	gagtgcagtg	gtgcaatcat	ggctcactgc	agcctcgaac	21780
	tctgggtctc	aagccatcct	cccactcag	cctcctaagt	agctgagatt	ataggctcct	21840
	cccaccacac	ctggctaatt	tttgtgcttt	ttgtggagac	acagattctc	catgttgccc	21900
	aggctggtct	ccaactcctg	gggtcaaagg	atcctcctgc	ctcggtcttc	caaagtgcgtg	21960
	ggattacagg	cgtgagccac	tgcgcctggc	ccagaacact	tgctatttcc	tcaccattgc	22020
15	tttatttctt	ctatgaagat	ttcactggaa	ttatcagatt	aatttgctta	tttgtttact	22080
	gtctgtttgt	cacccatgac	tggaatgtat	actctaggaa	ggcagggata	taatccaatg	22140
	ggtttactgc	tgaccccta	gtaccagaa	gagtgccttg	cacctgataa	gtgtctgggg	22200
	aacttgctac	atgaattaca	tgtgtcagat	gggatactctg	ttcgtctttc	ttctctcttt	22260
	tttctttctc	tctttctctc	tctctttctt	tctctttctt	tctttttctt	ttttttgaga	22320
20	taaggctctg	ctctgtcacc	caggctagag	tgcagtgggtg	caatcatggc	tcactgcaac	22380
	cttgaacatg	tgggtctcaag	cgatcctccc	acctcaggct	accaaatagc	taagactaca	22440
	gaggtgcgta	gctatgcccc	gctaattaaa	aaaaaaaaaa	tttttttttt	tttttagaga	22500
	tgggggtctc	aatatcttgc	ccaggttggt	cttgaactcc	taggctcaag	caatccccct	22560
	gccttgccct	cccaaagtgc	tgggattata	ggcatgagcc	attgcagctg	gcccagacag	22620
25	aatctcattt	cagcccgaca	actttgtgac	atcattattt	tcattcttaa	cacctagggt	22680
	gatcccgact	caaccacttg	ccatctgtgt	gaactgtggg	caagtgaact	tacctttcgg	22740
	agcctcagtt	gccccatcta	taaaatggga	atgatgccag	tgccctgcctc	ataaggatga	22800
	gccccgctcc	tgaagctcag	ggagccctct	ctgcaaggct	gttttagtgc	aacctccgga	22860
	aacatgcccc	tgcatgtgaa	aactggcatg	cacattctgg	tgcttttaaa	aacatctcga	22920
30	agcctatcca	cagatcctgg	acctcaagac	tgggtcagtg	ctagccccc	attttacaga	22980
	tgtggagaat	gaggcttagc	gggtcccagg	caagtcagtg	gcaaaaactca	ccatctcctg	23040
	ggagccatca	ggttctctctg	gatctgcccc	caccaaattt	atccccctgt	ctctgtctga	23100
	gggtgcacat	gggggtgagg	tgggggtctt	tgtttttact	ccctccccct	cctgaggagt	23160
	cagtaacca	cagtgtctgt	gcctggaata	ttaatgtctc	agcagctttt	gtttgggggg	23220
35	ttgggggtgg	tgggggagg	actttctggt	cagagagggg	ctgagctttg	gggactgagg	23280
	cactggccct	ttaaactgtg	ttgacagcca	ggagtcgtca	tggggatggg	gcttggaata	23340
	ggggacaggg	aggggttggg	aaagagtggc	ggagcaggta	atgcgtaaga	cccaggaatc	23400
	cagcccccaa	ctacctctc	tcccaggacc	caggagtcta	ggctcccagc	ccctcctcca	23460
	tcagggtcca	ggagtctgga	accccgctt	ctttccgcct	tagaccaggg	aattcagccc	23520
40	ccaaccacct	gctctctcag	gttcccga	tcagacccc	tagccccctt	ctcgcagcag	23580
	accaggagt	ctgggtctgc	agcagccct	tccttcaaac	ctaggagtca	gagccccag	23640
	ccctctccta	gcttagacac	aggagtctgg	gcctccagcc	ccctcctcct	tcaggaccca	23700
	ggagccaggg	gtccagagta	cacagctggt	ggatgtttcc	acggagacta	agcagggtgg	23760
	ggggagcgct	tcctgggtcc	tgagtcagcg	aatacccaag	ggagtctcaa	ggtcatagtt	23820
45	ccgggaagg	caccaaccac	ccctctgtat	ccgtcccca	gggggtcct	ggcatcctgc	23880
	ctccttcccc	cttctctctt	tagggagggtg	gtacatccct	gcgtcctgac	tgaaccccc	23940
	tcagcccccc	atcaattggc	gagtcggaac	atcctcgcac	aaagcgtcaa	ttcttcccc	24000
	gctcagcctt	ctgaaggcgc	ctgtattcgc	aggacctagg	cgtcagggtc	tcagccccct	24060
	ctcctcaga	aacctgcagt	ggaatcccc	gcctccagcc	ccttccctcc	tcaggaccca	24120
50	ggagtctgta	tcctcatccc	ttctccctc	aagacctagg	agtgtggact	cccagcccc	24180
	ttttccttcc	ggacacagga	gttccagccc	tcggccctct	cctctcttaa	accagggggt	24240
	ctaagacccc	agcctcctcc	tccttcaaac	tcaggagtct	aagatcccag	gccccctcct	24300
	cctcagactc	aggagtctaa	gatcccaggc	ccctcctccc	tcagactcag	gagtctaaga	24360
	ccccaggccc	ctctctctcc	agactcagga	gtctaagatc	ccaggcccc	cctccctcag	24420
55	accaggagt	ctaagacccc	agccctcct	ccctcagact	caggagtcta	agaccccagc	24480
	ccctcctccc	tcagactcag	gagtctaaga	ccccagcccc	ctcctccctg	gacccaggag	24540
	cctaagacct	cagccccctc	ctccttgaga	cccaggagtc	taagacccta	gctccctcct	24600
	ccttttagacc	cattagtcca	ggcccccaga	ccctcctcca	tcagaccag	gagtccaggc	24660

	ccccagcccc	tcctccatca	gatccagccc	ctcctctcct	gaaaactttt	gactctaact	24720
	ccccagtcct	caacccctag	aagcacagtc	ctgcctttcc	tcaatcctct	gtccccctccc	24780
	atctggggag	ctaggcatca	gggtggggcg	taggggtgag	tcagcaacct	cacacacaaa	24840
	gtccccgctg	tggcccccac	attcctggga	tattcgggac	tccttgatt	ccaggcctca	24900
5	ggccccagcca	gggagtgggg	agtccccag	aggctctccc	tgggtgtggg	gtacgagagg	24960
	aattcctgct	ccgggaaggg	tgcaggcctg	cactgagctc	cctctgtccg	aacctccacg	25020
	cccagtgcct	tctattcacc	ccctcttccc	agaagagccc	aggctcagca	cctgccccct	25080
	gccccactgg	gtgcccacgg	aggagcctgc	gtgcctgctc	cctatgggcc	tggggctctgc	25140
	acaggcgga	atcagtgggt	gcttcctgtc	tgatgccaca	ggccattgga	tgctggcggg	25200
10	tctgactgtc	tccaggccac	ccccaccccc	tcccagagag	agaaagctgc	ctttgtgttc	25260
	tccaagatgg	ggacaggcca	ggctcgcacg	acattaaacc	agccttaggc	cccagccctg	25320
	ctgtgtctaa	ggcttggaa	tccactgcag	aacctgaccc	ccacccccag	gctctgggga	25380
	cacaggcgcc	tggctcatgg	gtgggtgggt	gggggggtca	gtgatagaaa	cctccaaaac	25440
	ctgttccttg	gggtgactca	caatggaggg	agggtcccc	tattctcaag	agtggctggg	25500
15	cagaatttta	gcaggaaaaa	gtgagtcacc	ctgggaagga	aacattatct	agggaccaac	25560
	aactgcccc	tccacaagac	ccctcaactc	ctaatagcct	ctctattctt	tctttgtatt	25620
	ggatatctgt	tctctctcct	cctttctgtt	ctaccagtt	tctggctgcg	ggctccattt	25680
	ctgcctgggt	gcctcctctg	gcaggcaacc	catccctccc	tcttgctttc	tctcctctgc	25740
	ccacctggga	tccttctttg	ggcataaata	tcctcttctt	ctgctatgct	cagaagatga	25800
20	atgaaccagg	agagagagaa	catgttttta	aatggcgca	aatgcacccc	atctcccccg	25860
	attcctgctg	gctgggcaag	gtgagagagg	aagaagtac	taagagagaa	atgtgggaac	25920
	aacagatacc	ccctaaaatg	tggtagccaa	ggccactgag	aaatatccaa	tggaaaggag	25980
	agcaggaagg	gccctccaag	accacatgct	acagcctcct	accccatgct	ttacagaacg	26040
	ggaaagtaag	gcccagagag	ggacaaggac	tgatgcaaaa	ttatactaaa	gggtcctggg	26100
25	taaggcttgg	acccaagttc	cttagctccc	agctgagagc	tcttcccatg	acaccaagct	26160
	cagtttctac	tggtaaaagc	cacatactat	ttactttaga	gaaagttagc	agagaggggt	26220
	agggtgccag	gaagcagtga	cttggaatc	aaacgagggg	cagggtctga	gacctaaact	26280
	ccagaagcac	cagagaaagg	cttttgacg	ggcggggtgg	tcaccttaag	ctatatctctg	26340
	atcctgagaa	ttcaaagtct	gatgattcta	agctgtcagg	attctaaatg	tcatagatgt	26400
30	caagatccag	gaactccaag	acatcaagat	ttcacgattt	ttaagacgtc	aagatgctag	26460
	catgctaaca	ccatcacggg	tctagaactt	taaaggtgtc	aagattctaa	agccttctgg	26520
	attctagaat	cctgtagatg	tcagcattct	aaagtaccat	caggttcttt	atttactgga	26580
	ttcattagtt	ccaggattct	atgagcctgg	tgtttagcct	aaaaaataaa	gataaattaa	26640
	aattgatgga	aatgtcactg	aggtaccaa	gttctcatct	gggaaattgt	ggcatgtctg	26700
35	ttgtaaagaa	aggaggtaat	gatgcaagtt	ctaaagcagt	cacagaagac	tagagaagaa	26760
	agaaagacag	tgagaggaca	gctttgcccc	tcctcctggc	cgaggtgagg	atggctctgc	26820
	ctcaaaccct	ggagtgggga	acatgtaacc	gcactcaact	tgccagaaac	cccttcacgg	26880
	tctgagctgg	cgttcccttt	catgtcactg	agttcaacat	cctcacttta	cagaaagaga	26940
	aacagaagcc	tggagagagg	aaggtgttta	ccattggctg	cgatggcaaa	tggcaagagc	27000
40	caagatttaa	gcccaggccg	ccagcccat	gccacctggt	tataactcct	ctcaccaatc	27060
	tctgccgaac	acccagccct	cctgcttctg	cctagccacc	ttccaatcct	ctgttccttc	27120
	caaaagtggc	cttatccacc	agggaggggt	gaccctgggc	aggttcaaga	cttacacagt	27180
	gtgagagtgt	gtgtgggtga	catttctctg	ccttgtcccc	attctcaggg	tcacccaacc	27240
	tcgggggtct	ccagcttctc	acagtgtgtg	atgaggggat	gtggatggct	ccctggatgt	27300
45	cctggacagg	ggcttctctg	tgagtcaagc	ctgggtgtgt	gaatgggtga	gcaggggttg	27360
	gagaggcatt	cgctgaatcc	acgtgtgtgc	ctacacgcca	aggtccccc	ttctcacttc	27420
	cccacacaca	tgcacacaga	tgctccctc	cagggtctct	tagaatgccc	tgctgactgc	27480
	aattcctctt	caggggcaca	gagggataga	gagagggagg	aaggtaggat	gggaatggga	27540
	gatcccgga	tggaggctgt	aagcgtagag	agaggaggca	cagcagaaag	acagggatgg	27600
50	agatagtggg	acagagaagg	gggaaagaga	cagggtgacag	aaagggttag	agaaacgagt	27660
	gacagaaaga	caggggacag	agacaagggg	atggggcaga	taggggacag	agaaaaaggg	27720
	acagaaaaac	aagggtgaca	gcgagacaga	gacagggacc	aagaataggg	gcagagaggg	27780
	agggcagaaa	tccgggggaa	agagaataga	caggatgatg	gaggggacag	agtgacccag	27840
	gaaaagggga	cagagaccag	gggacagagg	taggggacaa	agacagaata	gatgaggaac	27900
55	accgaggcaa	gaagagaggg	agacagacag	aaggaggggac	aggacttcga	gactgagggg	27960
	tagaggacaa	gggttagggg	acgaggagcc	agacgggggg	gttcagagac	gggaggagag	28020
	agggacgcag	agactggaca	gaaggacagc	gggaccggcc	tggggagggg	ggacttgtgt	28080
	gtgtaggggg	gtctcggggc	ctttgtcccc	gccgggatcc	agcctgcgcg	ggtggggggg	28140

	ctgcggcacg	gcggccgggc	cccgcgcccc	ctcccccgct	cgtcgctccc	ggctcccggc	28200
	ccgcgctgcg	ctttgtcccc	gggagggggc	ccggcccggc	cccgcgcgca	ttgttcggcc	28260
	tctgcggccc	cgaggctgcc	gggctgtcac	cacagcgcgc	cccccgcccc	agcccggccg	28320
	gccgaccccc	gcccccgacc	ctacctggcc	ccgccgcggc	cgcccacagc	agcagcagcg	28380
5	gccactggaa	gcgccggggc	cggcccatgg	tgccgcggcc	gccgcgcgcg	ccgctcgcctc	28440
	ccggcccggc	acctgcaccg	cccgcgcgcg	ccgcccggcc	ccccgcgccc	cgccccctgc	28500
	ccgcccgggg	gcggggcgcc	gaggccgggg	cggggccggg	gaggggaggg	ggagacggag	28560
	gagaggcccc	gagacaatcg	gggggacggc	acggtggggg	aacggtgcgg	ggtgcgaaag	28620
	ctggagagga	gaggggtgag	gagggcggga	aggggtgcgc	gggagggcga	cagcggcgctg	28680
10	ggagcaggtg	ggggatctcg	gtgagcgccg	gaaatggagg	gtgttgggtg	aggggtgcctc	28740
	gtgcggggccc	agtgctgcgc	cgcgaggtgc	ggcagttgct	ggcatgcagg	gtgcttgccg	28800
	tgccgcggagg	ggaggggtgc	aggggtgttc	tggaggctgt	gcgaggggtg	gggcgcgggc	28860
	gtcgtggggg	gcggtgtgtg	cgaagggaga	gcgtggccag	cgtgacgggg	gagcgtaagg	28920
	gagggagtg	gacgtgggaa	aggtgagtg	gagaggcggt	ctgcgggcag	gtgggtgtct	28980
15	ggagtctagc	gagaggctgt	gagctgagcc	accgggacag	gggaggctgc	agctggaggt	29040
	ccggaggggtc	cggaggtcga	ggcaggtcaa	ggatctccca	gggcagggcg	aggtggggc	29100
	tcaggagtag	ggtggggctc	gttccctccc	tcctctctc	ctgtcctgac	ctgaaaaccc	29160
	cgtgtttccg	agtcattctc	cgggaggggc	cccctgaaag	tgaactaact	ggaagggaagc	29220
	ctgaatcctg	ggtcccagga	gggagagggt	cctgtgaaca	ccttccaagc	cctggcgctc	29280
20	cctctcctcc	ctgctgtctc	cctgccccag	cctctctccc	tctctctgca	tgtatttgcc	29340
	tctgcccttc	ctctctcccc	atctttgagg	gtgactcacc	cctccagact	taggtccctt	29400
	ctccctcctg	ggagtggggt	tccttgagcc	cacttctgtg	acaccctgta	gacctgatgc	29460
	gggatcatta	cctatgggac	ccagaaagag	tgagaaacca	tggaaagaag	gcctcgacct	29520
	ctctcatgcc	catttgtcag	gcaaactgag	gtccagaagt	gccaattatg	aacatctttc	29580
25	cttcccccc	gccccctccc	cgccacagcg	gagctcgcct	ctgttgccca	ggctggagtg	29640
	cagtggcacg	atctcgactc	actgcaacct	ctgcctccca	ggttccagtg	attctcctgc	29700
	ctcagcctcc	cgagtagctg	agattacagg	cgcccgccac	catgcctagc	taatttttat	29760
	atTTTTtagta	gagacggagt	tttgccatgc	tggccaggct	ggtcttgaac	tccttacctc	29820
	aggtgatcca	tctgtctggc	ctcccaaagt	gctggattac	aggcgtgagc	caccatgcct	29880
30	ggctgaaaaat	ccttactttt	tattccgact	aaaaaatTTT	acatccagtc	ccacaaggga	29940
	cttcagcttc	acacaccctt	tctgtcctca	gtaccagct	cccagtatcc	tttctgacct	30000
	caaaaccata	acccttgtgt	cccaggacca	tggctcccag	tgtcttctct	30060	
	gtcctcaggg	tccaagctcc	catcaactcc	tgtgtcctca	ggaccacggc	tcccagcatc	30120
	ctctctgtcc	ttcagggtcca	agctcccatc	aaccctgtg	aagcaggacc	atggctccca	30180
35	gcatectctc	tgtcctcagg	gtccaagctc	ctatcaactc	ctgtgtcccc	aggacgatgg	30240
	ctccagcaat	cctctctgtc	ctgagagccc	aagcttctaa	ctgcccctgt	gtccccagat	30300
	ccatagccct	gagcaacttc	cttctttttc	agtcctcagc	ttcccagctt	ctgtagactt	30360
	gggaagagat	agtctcta	cctctttcca	gggctcacat	tctgtgactt	ttgctagatg	30420
	ggagagggaat	gtttgtatctg	ccttttgaat	actggtccaa	ggggtaacta	gtagttgcct	30480
40	tttcccgag	gagccaatag	gcccgtcac	tctgtgtctc	gacagatgtc	tcctgtctcca	30540
	gctgaagggg	aaccttggga	gatgttgggt	tggttctcac	ctgtcatcct	taagtccac	30600
	cattccatgt	gaagacatca	caagagtagt	ggtcctgacg	ggcgcgttgg	ctcacacctg	30660
	taatcccagc	actttgggag	gccaagggtg	gccgatcact	tgaggtcagg	agtttgagac	30720
	cagcctgacc	aaccggccaa	catggtgaaa	caccatcttt	acaaaaaaa	aaaaaaaaaa	30780
45	ttagcaaggc	gtggtggcac	gtgcctgtaa	tcccagctgg	tcggaaggct	gaggcatgag	30840
	aatccccctga	acttgggagg	cagaggttgc	agttagctaa	gatcatgcca	ctgactcca	30900
	gctgggtga	cagaatgaga	ctcagtctaa	ataataataa	taataataat	aataataata	30960
	ataataataa	taaatagaat	agtggctctg	tccccatcct	acttcagggt	accctgtcca	31020
	ttagggattt	agtgcagggtg	acagcaagtg	caaccctaat	ggtttgagag	aaagagaact	31080
50	ggttcacaca	taacaaaaag	tccttctatg	gctggctttg	gcgaggtctg	tcaatctctg	31140
	tcctaaggat	gcatggctcc	cctcctgtag	caagatggct	ggcagatacc	cctggggcca	31200
	gattcatatt	tgggggtgatt	aagattctgc	aagagagaga	caacctttat	ttcacacagc	31260
	ttttcaattg	ttgctgttcc	ctggtagagc	tcggagacct	agctcttgcc	tggtttctaa	31320
	actttcaata	acaccgtttt	tgtttaagtc	agcacaataa	gattttattt	cttgcaagca	31380
55	aagattcctg	aacaacaact	tcagagccgt	taacaatag	gtcctgatca	caagctatgg	31440
	tataggacgt	gagaaatttg	tcctagcct	caatatctgc	tggagggcat	catggaataa	31500
	gtatttctat	cctctgatcc	ccactgtagg	gcatcatggg	atatataatc	ctaacccttca	31560
	atctctgcc	tagagtttca	taggcaatgc	agtcctagcc	tcaatatgtt	gtagggaatt	31620

	atgggaaagg	tgaaattatc	ctcaattata	atacagagca	tctcagaaaa	tgtcgtttta	31680
	gcctcatctc	tgctgtaggg	catcatggga	gatatacttc	tggcccaatt	tttgttgtaa	31740
	gttgccatag	aagatgcagt	ctttccttcc	ttcccttttt	tcttttcttt	ctttctttct	31800
	tttttttttt	ttttattatg	tagagacagg	gtctctcgct	atggtgcccc	ggctggctct	31860
5	gaactcctgg	gctcaagcag	ttctcctgcc	ttggcctccc	aaagtgcctg	gattacaggc	31920
	aagagccatt	gcacccagtc	ccttctctcc	tttctttctt	catcacctgc	catattccag	31980
	gcactaggaa	taaatcatca	agtaaataaa	cggccttacc	ctccctggca	attataatgg	32040
	ggaaagttag	ctaaaaacaa	acaaaaatta	ctgttccatt	taaccatcgc	tgaataacaa	32100
	aataccccag	aacgtagtgg	tgtgaaacaa	caacctttta	attttatgat	tctgtgagtc	32160
10	aggaattgga	gcaggattgg	tgtgtatctg	cttcatgatg	aactggagcc	aaaaatgaac	32220
	tagctggaac	agctggagat	ggaggggagg	ggcatcaagg	gcatatatac	taaggctggg	32280
	ggttgggtgt	gtgggttttg	aatagtgtcc	tccaagtaaa	atatatgttg	aagttctagc	32340
	ccctgggtatc	tgtacatgtg	accttatttg	gaaataaaat	ctttgcaaat	gtaattcact	32400
	tttttgtttg	tttgtttgtt	tgtctgagac	tgagtctcgc	tctgtcacc	aggctggagt	32460
15	gcagtggcat	gatctcggct	cactgtaacc	ttcacctcct	gggttcaagc	gattctcctg	32520
	cctcagcctc	ccaagtagct	gggattatag	gcacgtgtca	ccatgcccag	ctaatttttg	32580
	tattttcagt	agggacgggg	tttcaccatg	ttggccaggc	tgggtctcgaa	ctcctgacct	32640
	caaatgatct	agctggcatg	cctcccaagg	tgtctggatt	ataggcatgg	ggcactgcac	32700
	cctgcccaga	tgtgattaac	ttctaacccc	tggtatcttt	gcatgtgact	ttatttggaa	32760
20	ataaggtggg	tttttttctt	gttttttttt	ttttttttga	gacagtttca	ctttgtcgct	32820
	caggctggag	ttcagttgca	taatctcagc	tactgaaac	ctctgcctcc	gaggctcaag	32880
	cgatcctccc	gcctcagctc	cccagctcac	tgggactacg	ggcaagcgcc	accacacccg	32940
	gctaattggt	gcagtttttg	tagagatggg	gttttgccat	gttgcccagg	cggctctccaa	33000
	ttgccaccct	caagcaattc	atccgcctcg	gcctcccaga	gtgctggaat	tataggtgtg	33060
25	agccatggcg	cccgccaga	aagtctttgc	agatttagtt	gaattaatga	ctaaatgttt	33120
	ccatgtctgag	ttagagtggg	ctctaaatcc	aatgattgat	atggggttat	aaggagagat	33180
	atgtggagac	atagccacag	tcccagggaa	ggtggacatt	ggaagacaga	ggtagggatt	33240
	agagtgatgc	agctacaagc	caaggaatgg	caaagattgc	tggcagctcc	tcagaagcaa	33300
	aggagaggca	aggaaggggt	cttcccctga	gacttttttt	tttttttttg	agacggagtc	33360
30	tcaactgctgt	cagcctcagc	tggagtgcaa	tggcgcgatc	tcggctcact	gcaacctctg	33420
	cctcccagggt	tccagcaatt	ctcctgcctc	agcctcccga	gtaactgaga	ttacaggcac	33480
	ccgccaccat	gcctggctat	tttttgcatg	tttagtagag	atgggatttc	accctgtttg	33540
	ccaggctggt	ctcgaactcc	tgacctcagg	tgatccaccc	gcctcggcct	cccaaagtgc	33600
35	tgggattaca	ggtgtcagcc	ccggagactt	taaaagcatg	gctcttcccc	tgacgcttta	33660
	aaagcgtggc	tcttcccgtg	agacttcaac	accttgggtt	tggacattta	gcattcagaa	33720
	ctgtgagaga	acaagtttct	agtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	tgtgtgtgtg	33780
	tgtgtgtgtg	tgtgttttag	acagaggctc	attctgttgc	ccaggctgga	gtgcagtggg	33840
	tcaatctcgg	ctcactgcaa	actccgcttc	tcagattcaa	gtgattctta	tgccctcagcc	33900
	tcccaagttag	ctggaattac	agaggagcgc	catcacagcc	ggctattttt	tttttttttt	33960
40	tttgtacttt	tagtagagac	agggtttcac	tgtgttggcc	aggctggtct	caaattcctg	34020
	gcctcaagtg	atatgcctgc	cttggcctcc	caaagtgtcg	ggattacagg	tgtaagccac	34080
	cacacctggc	ctaagtttct	gtgtgtgtgt	gtgtgtgttt	tgttttgttt	tttttttttt	34140
	tttgagtggg	gtctcgctct	gttgcccagg	ctggagtgca	gtggcatgat	ctcgactcac	34200
	tgcaagctcc	gcctcccggg	ttcacgccat	tctcctgcct	cagcctcccc	agtagctggg	34260
45	actacaggca	cccaccacca	cgcccagtta	attttttcta	tttttaatat	tgacaggggt	34320
	tcatcatggt	agccaggatg	gtctcgatct	cctgacctcg	tgatccgccc	gcctcagcct	34380
	ccgaatttgc	tgggattaca	ggcatgagcc	accaaaccgg	gccaagtttc	tgtgggtttt	34440
	agccaccttg	cttgtaagat	ttgtgtgtgt	gtgtttttaa	ttttttattt	ttaagtatta	34500
	tgaatacata	atagtgggtg	atattttacag	gacatatgta	atatgggttt	gggttttagt	34560
50	gttttttttt	tggagacaga	gtctggctct	gttgcccagg	ctggagtaca	gtgggtgggat	34620
	catggctcac	tgcagccttg	acctcccggg	ctcaagggat	cctcctgcct	cagcctccca	34680
	tgtaaactagg	accacaggca	tgcccacca	catccagcca	attttttttt	attttttagtg	34740
	gagatgaggt	ctcactgtgt	tgcccaggct	gatcttgaac	tcctgagctc	aagagatctt	34800
	cctttctcac	cctcccaaag	tgctaggact	acaggcatga	gccactgtgc	ctgtccttcc	34860
55	atgatgtttt	gatataggca	cacaatgtgt	tagtttataa	agtttgaat	aatttatcac	34920
	aggcagccct	aggaaactaa	tatagccaag	tttctctgtt	cttctctata	tcacatctgc	34980
	tggggctaca	tgtccaaggt	ggcttcttca	cccacttgtc	tgggtgcctgg	gctgagatgg	35040
	ctgaaacatc	tggggctcta	tctccacatg	gcatttatac	atgagtagct	tgggcttctc	35100

cacagcatgg tgggtctcagg gcagtagtac ttttacatgg caaccagctt cccagagtg 35160
 agcgttctaa gattcagaaa gtgaaaaatg aaagttttctt aaaacttggg tccagaacat 35220
 agcacagcaa aacttccacc acattctact ggtcaaagca gtcacagagt cactcatatt 35280
 caagaggcag aagtagacac ctcaatttctt taagccacta cagtgcacagg tggatgatatg 35340
 5 tcattagaga aagccctaaa caagaacctt gtccctcacc tgcccccaaa taccatggaa 35400
 gatgtctttt tttttttttt tttttttttt gggatagtct cactgtgtca tgcagtggg 35460
 tgatc 35465

10 <210> 57
 <211> 14327
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 57
 ggccggcgag cgggcggtcg cgggcggtcg ggagcgggag gcgaggagag agcagagcag 60
 agagcggcgc gggcggggcc atgggggtggc gggcgccggg cgcgctgctg ctggcgctgc 120
 tgctgcacgg gcggtgctcg gcggtgaccc atgggctgag ggcatacgat ggcttgtctc 180
 tgctgagga catagagacc gtcacagcaa gccaaatgcg ctggacacat tcgtaccttt 240
 20 ctgatgatga gtacatgctg gctgacagca tctcaggaga cgacctgggc agtggggacc 300
 tgggcagcgg ggacttccag atgggttatt tccgagccct ggtgaatttc actcgctcca 360
 tcgagtacag ccctcagctg gaggatgcag gctccagaga gtttcgagag gtgtccgagg 420
 ctgtggtaga cacgctggag tcggagtact tgaaaattcc cggagaccag gttgtcagt 480
 tgggtgtcat caaggagctg gatggctggg tttttgtgga gctcgatgtg ggctcggaag 540
 25 ggaatgcgga tgggtgctcag attcaggaga tgctgctcag ggtcatctcc agcggctctg 600
 tggcctccta cgtcacctct cccaggggat tccagttccg acgctgggc acagtgcctc 660
 agttcccaag agcctgcacg gaggccgagt ttgcctgcca cagctacaat gagtgtgtgg 720
 ccctggagta tcgctgtgac cggcggtccc actgcaggga catgtctgat gagtcaatt 780
 gtgaggagcc agtccctggg atcagcccca cattctctct ccttgtggag acgacatctt 840
 30 taccgccccg gccagagaca accatcatgc gacagccacc agtcacccac gctcctcagc 900
 ccctgcttcc cgggtccctc agggccctgc cctgtgggccc ccaggaggcc gcatgccgca 960
 atgggctcgt gactccctga gactacctct gcgacggaga ggaggactgc gaggacggca 1020
 gcgatgagct agactgtggc ccccgccac cctgtgagcc caacgagttc ccctgaggga 1080
 atggacattg tgccctcaag ctgtggcgct gcgatggtga ctttgactgt gaggaccgaa 1140
 35 ctgatgaagc caactgcccc accaagcgtc ctgaggaagt gtgcgggccc acacagttcc 1200
 gatgcgtctc taccacatag tgcatccag ccagcttcca ctgtgacgag gagagcgact 1260
 gtccctgacc gagcgacgag tttggctgca tgcccccca ggtggtgaca cctccccggg 1320
 agtccatcca ggcttcccg ggccagacag tgaccttcac ctgctgggccc attggcgctc 1380
 ccacccccat catcaattgg aggtcaact ggggccacat cccctctcat ccagggtga 1440
 40 cagtgcacag cgagggtggc cgtggcacac tgatcatccg tgatgtgaag gagtgcagac 1500
 aggggtgccta cacctgtgag gccatgaacg cccggggcat ggtgtttggc attcctgacg 1560
 gtgtccttga gctcgtccca caacgaggcc cctgccctga cggccacttc tacctggagc 1620
 acagcgccgc ctgcctgccc tgcttctgct ttggcatcac cagcgtgtgc cagagcacc 1680
 gccgttccg ggaccagatc aggtctgcgt ttgaccaacc cgatgacttc aagggtgtga 1740
 45 atgtgacaat gcctgcgcag cccggcacgc caccctctc ctccacgcag ctgcagatcg 1800
 accatccct gcacgagttc cagctagtag acctgtccc cgcttctc gtccacgact 1860
 ccttctgggc tctgctgaa cagttcctgg gcaacaagg ggactcctat ggcggctccc 1920
 tgcgttaca cgtgcgtac gagttggccc gtggcatgct ggagccagt gacggcccg 1980
 acgtggtcct cgtgggtgcc gggtagccgc tctctccc aggccacaca cccaccaac 2040
 50 ctgggtgctc gaaccagcgc caggtccagt tctctgagga gactgggtc catgagtctg 2100
 gccggccggt gcagcgcgcg gagctgctgc aggtgctgca gagcctggag gccgtgctca 2160
 tccagaccgt gtacaacacc aagatggcta gcgtgggact tagcgacat gccatggata 2220
 ccacgtcac ccatgccacc agccatggcc gtgccacag tgtggaggag tgcagatgcc 2280
 ccattggcta ttctggcttg tctctcgaga gctgtgatgc ccacttcact cgggtgcctg 2340
 55 gtggggccta cctgggcacc tgctctgggt gcagttgcaa tggccatgcc agctcctgtg 2400
 accctgtgta tggccactgc ctgaattgcc agcacaacac ggaggggcca cagtgcacaa 2460
 agtgcaaggc tggcttcttt ggggacgcca tgaaggccac ggccacttcc tgccggccct 2520
 gcccttgccc atacatcgat gcctcccga gattctcaga cacttgcttc ctggacacgg 2580

	atggccaagc	cacatgtgac	gcctgtgccc	caggctacac	tggccgccc	tgtgagagct	2640
	gtgcccccg	atacagaggg	aaccccatcc	agcccgccg	gaagtgcagg	cccgtcaacc	2700
	aggagattgt	gcgctgtgac	gagcgtggca	gcattggggac	ctccggggag	gcctgccgct	2760
	gtaagaacaa	tgtggtgggg	cgcttgtgca	atgaatgtgc	tgacggctct	ttccacctga	2820
5	gtaccgaaaa	ccccgatggc	tgccctcaagt	gccttctgcat	gggtgtcagt	cgccactgca	2880
	ccagctcttc	atggagccgt	gcccagttgc	atggggcctc	tgaggagcct	ggtcacttca	2940
	gcctgaccaa	cgccgcaagc	accacacca	ccaacgaggg	catcttctcc	cccacgccc	3000
	gggaactggg	attctcctcc	ttccacagac	tcttatctgg	acctacttc	tggagcctcc	3060
	cttcacgctt	cctgggggac	aagggtgacct	cctatggagg	agagctgcgc	ttcacagtga	3120
10	cccagaggtc	ccagccgggc	tccacacccc	tgacggggca	gccgttggtg	gtgctgcaag	3180
	gtaacaacat	catcctagag	caccatgtgg	cccaggagcc	cagccccggc	cagccccaga	3240
	ccttcattgt	gcctttccgg	gagcaagcat	ggcactggcc	cgatggggcag	ccagccacac	3300
	gggagcacct	gctgatggca	ctggcaggca	tcgacaccct	cctgatccga	gcatactacg	3360
	cccagcagcc	cgctgagagc	agggtctctg	gcatacagcat	ggacgtggct	gtgcccagag	3420
15	aaaccggcca	ggaccccgcg	ctggaagtgg	aacagtgtct	ctgcccaccc	gggtaccgtg	3480
	ggccgtcctg	ccaggactgt	gacacaggct	acacacgcac	gccagtggtc	ctctacctgg	3540
	gtacctgtga	acgctgcagc	tgccatggcc	actcagaggc	ctgcgagcca	gaaacagggtg	3600
	cctgccaggg	ctgccagcat	cacacggagg	gccctcggtg	tgagcagtg	cagccaggtg	3660
	actacgggga	cgccacagcg	gggacaccac	aggactgcca	gctgtgcccc	tgctacggag	3720
20	acctgtctgc	cgccagggtc	gcccacactt	gttttctgga	cacagacggc	caccccaact	3780
	gtgatgcgtg	ctccccaggc	cacagtgggc	gtcactgtga	gaggtgcgcc	cctggctact	3840
	atggcaaccc	cagccagggc	cagccatgcc	agagagacag	ccaggtgcca	gggcccatag	3900
	gctgcaactg	tgacccccaa	ggcagcgtca	gcagccagtg	tgatgctgct	ggtcagtgcc	3960
	agtgaaggc	ccaggtagaa	ggcctcaact	gcagccactg	ccggccccac	cacttccacc	4020
25	tgagtgccag	caacccagac	ggctgcctgc	cctgcttctg	tatgggcac	accagcagtg	4080
	gcgccagctc	tgccctacaca	cgccacctga	tctccaccca	ctttgcccct	ggggacttcc	4140
	aaggctttgc	cctgggtgaac	ccacagcgaa	acagccgcct	gacaggagaa	ttcactgtgg	4200
	aacccgtgcc	cgaggggtgcc	cagctctctt	ttggcaactt	tgcccaactc	ggccatgagt	4260
	ccttctactg	gcagctgccg	gagacatacc	agggagacaa	ggtggcgcc	tacgggtgga	4320
30	agttgcgata	caccctctcc	tacacagcag	gcccacaggg	cagcccaactc	tccgacccc	4380
	atgtgcagat	cacgggcaac	aacatcatgc	tagtggcctc	ccagccagcg	ctgcagggcc	4440
	cagagaggag	gagctacgag	atcatgttcc	gagaggaatt	ctggcgccgg	cccgatgggc	4500
	agccggccac	acgcgagcac	ctcctgatgg	cactggccga	cctggatgag	ctcctgatgc	4560
	ggggccaggtt	ctcctccgtg	ccgttgggtg	ccagctcag	cgagtcagc	ctggaggctg	4620
35	cccagccggg	gcccctcaaac	agaccccgcg	ccctcgaggt	ggaggagtgc	cgctgcccgc	4680
	caggctacat	cggtctgtcc	tgccaggact	gtgcccccg	ctacacgcgc	accgggagtg	4740
	ggctctacct	cgccactgc	gagctatgtg	aatgcaatgg	ccactcagac	ctgtgccacc	4800
	cagagactgg	ggcctgctcg	caatgccagc	acaacgcgc	aggggagttc	tgcgagcttt	4860
	gtgcccctgg	ctactacgga	gatgccacag	ccgggacgcc	tgaggactgc	cagccctgtg	4920
40	cctgcccact	gaccaaccca	gagaacatgt	tttcccgcac	ctgtgagagc	ctgggagccg	4980
	gcgggtaccc	ctgcacggcc	tgcaaacccg	gctacactgg	ccagtaactgt	gagcagtgtg	5040
	gcccagggtta	cgtgggtaac	cccagtggtg	aagggggcca	gtgcctgcca	gagacaaacc	5100
	aagccccact	ggtgggtcag	gtccatcctg	ctcgaagcat	agtgccccaa	ggtggctccc	5160
	actccctgcg	gtgtcaggtc	agtgggagcc	caccccaacta	cttctatttg	tcccgtagag	5220
45	atggggcgcc	tgtgcccagc	ggcaccacag	agcgacatca	aggctccgag	ctccacttcc	5280
	ccagcgtcca	gcccctcggt	gctggggctc	acatttgca	ctgcccgaat	ctccaccaat	5340
	ccaataggag	ccgggcagag	ctgctggtca	ctgaggtccc	aagcaagccc	atcacagtga	5400
	ctgttgaggga	gcagcggagc	cagagcgtgc	gccccggagc	tgacgtcacc	ttcatctgca	5460
	cagccaaaag	caagtcccca	gcctataccc	tggtgtggac	ccgcctgcac	aacgggaaac	5520
50	tgccccaccg	agccatggat	ttcaatggca	tcctgacct	tcgcaacgtc	cagctgagtg	5580
	atgcaggcac	ctacgtgtgc	accggctcca	acatgtttgc	catggaccag	ggcacagcca	5640
	ctctacatgt	gcaggcctcg	ggcaccttgt	ccgcccccg	ggtctccatc	catccgccac	5700
	agctcacagt	gcagcccggg	caactggcgg	agttccgctg	cagcgcacac	gggagcccca	5760
	cgccccccct	cgagtggaca	ggggggcccc	gcggccagct	ccctgcgaag	gcacaaatcc	5820
55	acggcgccat	cctgcgcctg	ccagctgtgc	agccccggga	tcaggcccag	tacttggtgc	5880
	gagccacag	cagcaggtgg	cagcaggtgg	agccggctgt	gctccacgtg	catggggggc	5940
	gtggggccag	agtccaagtg	agcccagaga	ggacccaggt	ccacgcaggc	cggaccgtca	6000
	ggctgtactg	cagggtgca	ggcgtgccta	gcgccaccat	cacctggagg	aagggaaggg	6060

	gcagcctccc	accacaggcc	cggtcagagc	gcacagacat	cgcgacactg	ctcatcccag	6120
	ccatcacgac	tgctgacgcc	ggcttctacc	tctgogtggc	caccagccct	gcaggcactg	6180
	ccaggcccc	gatgcaagt	gttgtccttt	cagcctcaga	tgccagccca	ccgggggtca	6240
	agattgagtc	ctcatcgctt	tctgtgacag	aagggcaaac	actcgacctc	aactgtgtgg	6300
5	tggcagggtc	agcccatgcc	caggtcacct	ggtagaggcg	agggggtagc	ctgcctcccc	6360
	acaccaggt	gcacggctcc	cgtctgcggc	tccccaggt	ctcaccagct	gattctggag	6420
	aatatgtgtg	cogtgtggag	aatggatcgg	gccccaaagg	ggcctccatt	actgtgtctg	6480
	tgctccacgg	cacccattct	ggccccagct	acacccaggt	gcccggcagc	acccggccca	6540
	tccgcacoga	gcccctcctcc	tcacacgtgg	cggaaagggca	gaccctggat	ctgaactgcg	6600
10	tggtgcccc	gcaggccca	gcccaggtca	cgtggcacia	gcgtgggggc	agcctccctg	6660
	ccgggaccca	gaccacggc	tcgctgtgc	gggtgaccca	ggtagccccg	gccgactcag	6720
	gcgagtatgt	gtgccatgtg	gtgggcacct	ccggccccct	agaggcctca	gtcctgggtca	6780
	ccatcgaagc	ctctgtcatc	cctggaccca	tcccacctgt	caggatcgag	tcttcatect	6840
	ccacagtggc	cgagggccag	accctggatc	tgagctgcgt	ggtaggcagg	caggcccacg	6900
15	cccaggtcac	atggtacaag	cgtgggggca	gcctccctgc	ccggcaccag	gttcgtggct	6960
	ccgcctgta	catcttccag	gcctcacctg	ccgatgcggg	acagtacgtc	tgccggggca	7020
	gcaacggcat	ggaggcctcc	atcacgggtc	cagtaactgg	gaccagggg	gccaacttag	7080
	cctaccctgc	cccgccagc	cagcccactc	cagtcagagc	ctcctcctcg	caagtggcgg	7140
	aagggcagac	cctggatctg	aactgcgtgg	tgcccgggca	gtcccatgcc	caggtcacgt	7200
20	ggcacaagcg	tgggggcagc	ctccctgtcc	ggcaccagac	ccacggctcc	ctgctgagac	7260
	tctaccaagc	gtcccccgcc	gactcggggc	agtacgtgtg	ccgagtgttg	ggcagctccg	7320
	tgccctctaga	ggcctctgtc	ctgggtacca	ttgagcctgc	gggctcagtg	cctgcacttg	7380
	gggtcacccc	cacgggtccg	atcgagtcac	cgtcttcgca	agtggccgag	gggcagaccc	7440
	tggacctgaa	ctgcctcgtt	gctgggtcagg	cccattgcca	ggtcacgtgg	cacaagcgcg	7500
25	ggggcagcct	cccgcccg	caccaggtgc	atggctcgag	gctacgcctg	ctccaggtga	7560
	cccagctga	ttcaggggag	tacgtgtgcc	gtgtgggtcg	cagctcaggt	acccaggaag	7620
	cctcagtcct	tgtcaccatc	cagcagcgcc	ttagtggctc	ccactcccag	ggtgtggcgt	7680
	accccgctcc	catcgagtcc	tctcagcct	ccctggccaa	tggacacacc	ctggacctca	7740
	actgcctggt	tgccagccag	gctccccaca	ccatcacctg	gtataagcgt	ggaggcagct	7800
30	taccagcccg	gcaccagatc	gtgggtctcc	ggctgcggat	ccctcaggtg	actccggcag	7860
	actcggggca	gtacgtgtgt	cacgtcagta	acggtgcagg	ctcccgggag	acctcgctca	7920
	tcgtcaccat	ccagggcagc	ggttcctccc	acgtgcccag	cgtctcccca	ccgatcagga	7980
	tcgagtcgtc	ttccccacg	gtgggtggaag	ggcagacctt	ggatctgaac	tgctgtgtcg	8040
	ccaggcagcc	ccaggctatc	atcacatggt	acaagcgtgg	gggcagcctt	ccctcccgac	8100
35	accagaccca	tggctcccac	ctgcgggttc	accaaagtgc	tgtggctgac	tcggggcagt	8160
	atgtgtgccg	ggccaacaac	aacatcgatg	ccctggaggc	ctccatcgtc	atctccgtct	8220
	cccctagcgc	cggcagcccc	tccgccccctg	gcagctccat	gcccattcaga	attgagtcac	8280
	cctcctcaca	cgtggccgaa	ggggagaccc	tggatctgaa	ctgcgtggtc	cccgggcagg	8340
	ccatgtccca	ggtcacttgg	cacaagcgtg	ggggcagcct	ccccagtcac	catcagaccc	8400
40	cggtctcacg	gctgcggctg	caccatgtgt	ccccggccga	ctcgggtgaa	tacgtgtgcc	8460
	gggtgatggg	cagctctggc	ccccgtgagg	cctcagtcct	ggtcaccatc	gaagcctctg	8520
	gctcaagtgc	tgtccacgtc	cccgccccag	gtggagcccc	acccatccgc	atcgagccct	8580
	cctcctcccc	agtggcagaa	gggcagaccc	tggatctgaa	gtgcgtgggtg	cccgggcagg	8640
	cccacgcccc	ggtcacatgg	cacaagcgtg	gaggaaacct	ccctgcccgg	caccaggtcc	8700
45	acggcccact	gctgaggctg	aaccaggtgt	ccccggctga	ctctggcgag	tactcgtgcc	8760
	aagtgaccgg	aagctcaggc	accctggagg	ccctgtcctt	ggtcaccaat	gagccctcca	8820
	gcccagagcc	cattcctgct	ccaggactgg	ccagcccat	ctacatcgag	gcctcctctt	8880
	cacacgtgac	tgaagggcag	actctggatc	tgaactgtgt	ggtagccccg	caggccccatg	8940
	cccaggtcac	gtggtacaag	cgcgggggca	gcctccccgc	ccggcaccag	acccatgggt	9000
50	cccagctgcg	gtccacctc	gtctccccctg	ccgactcagg	cgagtatgtg	tgctgtgcag	9060
	ccagcggccc	aggccctgag	caagaagcct	ccttcacagt	caccgtcccc	cccagtggag	9120
	ggtcttccta	cgcctttagg	agccccgtca	tctccatcga	cccggcccagc	agcaccgtgc	9180
	agcagggcca	ggatgccagc	ttcaagtgcc	tcatccatga	cggggcagcc	cccatcagcc	9240
	tcgagtggaa	gaccgggaac	caggagctgg	aggacaacgt	ccacatcagt	cccaatgggt	9300
55	ccatcatcac	catcgtgggc	acccggccca	gcaaacacgg	tacctaccgc	tgctgtggct	9360
	ccaatgccta	cgggtgtggc	cagagtgtgg	tgaacctcag	tgtgcacggg	ccccctacag	9420
	tgctcgtgct	ccccgagggc	cccgtgtggg	tgaagtgagg	aaaggctgtc	accctggagt	9480
	gtgtcagtg	cggggagccc	cgctcctctg	ctcgttggac	ccggatcagc	agcaccctgc	9540

	ccaagttgga	gcagcggaca	tatgggctca	tggacagcca	cgcggtgctg	cagatttcat	9600
	cagctaaacc	atcagatgcg	ggcacttatg	tgtgccttgc	tcagaatgca	ctaggcacag	9660
	cacagaagca	ggtggagggtg	atcgtggaca	cgggcgccat	ggccccaggg	gccccctcagg	9720
	tccaagctga	agaagctgag	ctgactgtgg	aggctggaca	cacggccacc	ttgcgctgct	9780
5	cagccacagg	cagccccgcg	cccaccatcc	actgggtccaa	gctgcgttcc	ccactgccct	9840
	ggcagcaccg	gctggaaggt	gacacactca	tcataccccg	ggtagcccg	caggactcgg	9900
	gccagtacat	ctgcaatgcc	actagccctg	ctgggcacgc	tgaggccacc	atcatcctgc	9960
	acgtggagag	cccaccatat	gccaccacgg	tcccagagca	cgcttcgggtg	caggcagggg	10020
	agacggtgca	gctccagtgc	ctgggtcacg	ggacaccccc	actcaccttc	cagtggagcc	10080
10	gcgtgggcag	cagccttccct	gggaggcgca	cgccagga	cgagctgctg	cactttgagc	10140
	gtgcagcccc	tgaggactca	ggcgcgtacc	gctgcgggt	cccaacaag	gtgggctcag	10200
	ccgaggcctt	tgcccagctg	ctcgtccaa	gcccccccg	ctctctccct	gccacctcca	10260
	tcccagcagg	gtccacgccc	accgtgcagg	tcacgcctca	gctagagacc	aagagcattg	10320
	gggcccagcg	tgagttccac	tgtgctgtgc	ccagcgacca	gggtacccag	ctccggttgt	10380
15	tcaaggaagg	gggtcagctg	cctccgggtc	acagcgtgca	ggatgggggtg	ctccgaatcc	10440
	agaacttggga	ccagagctgc	caagggacgt	atatatgcca	ggccccatgga	ccttggggga	10500
	agggcccagg	cgatgcccg	ctgggttatcc	aagccctgccc	ctcgggtgctc	atcaacatcc	10560
	ggacctctgt	gcagaccgtg	gtgggtggcc	acgcctgga	gttcgaatgc	ctggcattgc	10620
	gtgaccccaa	gcctcaggtg	acatggagca	aagttggagg	gcacctgcgg	ccaggcattg	10680
20	tgacagcggg	aggtgtcgtc	aggatcgccc	acgtagagct	ggctgatgctg	ggacagtatc	10740
	gctgcactgc	caccaacgca	gctggcacca	cacaatccca	cgtcctgctg	cttgtgcaag	10800
	ccttgcccca	gatctcaatg	ccccaaaga	tccgtgtgcc	tgctggttct	gcagctgtct	10860
	tcccctgcat	agcctcaggc	tacccactc	ctgacatcag	ctggagcaag	ctggatggca	10920
	gcctgccacc	tgacagcgc	ctggagaaca	acatgctgat	gctgccctca	gtccgacccc	10980
25	aggacgcagg	tacctacgtc	tgcacgccta	ctaaccgcca	gggcaaggtc	aaagcctttg	11040
	cccacctgca	ggtgccagag	cggtgggtgc	cctacttcac	gcagaccccc	tactccttcc	11100
	taccgctgcc	caccatcaag	gatgcctaca	ggaagttcga	gatcaagatc	accttccggc	11160
	ccgactcagc	cgatgggatg	ctgctgtaca	atgggcagaa	gcgagtccca	gggagcccca	11220
	ccaacctggc	caaccggcag	cccgaattca	tctccttcgg	cctcgtgggg	ggaaggcccc	11280
30	agttccgggt	cgatgcaggc	tcaggcatgg	ccaccatccg	ccatcccaca	ccactggccc	11340
	tgggccattt	ccacaccgtg	accctgctgc	gcagcctcac	ccagggtccc	ctgatttgtg	11400
	gtgactgggc	cccgttcaat	gggacctccc	agggcaagtt	ccagggcctg	gatctgaacg	11460
	aggaactcta	cctgggtggc	tatcctgact	atggtgccat	ccccaaaggc	gggctgagca	11520
	gcggcttcat	aggctgtgtc	cgggagctgc	gcattccagg	cgaggagatc	gtcttccatg	11580
35	acctcaacct	cacggcgcac	ggcatctccc	actgccccac	ctgtcgggac	cggccctgcc	11640
	agaatggcgg	tcagtgccat	gactctgaga	gcagcagcta	cgtgtgcgtc	tgcccagctg	11700
	gcttcaccgg	gagccgctgt	gagcactcgc	aggccctgca	ctgccatcca	gaggcctgtg	11760
	ggcccagcgc	cacctgtgtg	aaccggcctg	acggctcagg	ctacacctgc	cgctgccacc	11820
	tgggcccgtc	ggggttgccg	tgtgaggaag	gtgtgacagt	gaccaccccc	tcgtgtcgg	11880
40	gtgctggctc	ctacctggca	ctacccgccc	tcaccaacac	acaccacgag	ctacgcctgg	11940
	acgtggagtt	caagccactc	gcccctgacg	gggtcctgct	gttcagcggg	gggaagagcg	12000
	ggcctgtgga	ggacttcgtg	tcccctggcg	tgggtggcgg	ccacctggag	ttccgctatg	12060
	agttggggtc	agggtggcc	gttctgcgga	gcgccgagcc	gctggccctg	ggccgctggc	12120
	accgtgtgtc	tgacagcgt	ctcaacaagg	acggcagcct	gcgggtgaat	ggtggacgcc	12180
45	ctgtgctgcg	ctcctcgccc	ggcaagagcc	agggcctcaa	cctgcacacc	ctgctctacc	12240
	tgggggggtg	ggagccttcc	gtgccactgt	ccccggccac	caacatgagc	gtcacttccc	12300
	gcggctgtgt	gggcgaggtg	tcagtgaatg	gcaaacggct	ggacctcacc	tacagtttcc	12360
	taggcagcca	gggcacatggg	caatgctatg	atagctcccc	atgtgagcgc	cagccttgcc	12420
	aacatgggtg	cacgtgcatg	cccgtggcg	agtatgagtt	ccagtgcctg	tgctgagatg	12480
50	gattcaaagg	agacctgtgt	gagcacgagg	agaacccctg	ccagctccgt	gaacctgtc	12540
	tgcatggggg	cacctgccag	ggcaccgct	gcctctgcct	ccctggcttc	tctggccac	12600
	gctgccaa	aggctctgga	catggcatag	cagagtccga	ctggcatctt	gaaggcagcg	12660
	ggggcaatga	tgccccctggg	cagtacggag	cctatttcca	cgatgatggc	ttcctcgct	12720
	tccctggcca	tgtcttctcc	aggagcctgc	ccgaggtgcc	cgagaccatc	gagctggagg	12780
55	ttcggaccag	cacagccagt	ggcctcctgc	tctggcaggg	tgtggaggtg	ggagaggccg	12840
	gccaaggcaa	ggacttcata	agcctcgggc	ttcaagacgg	gcacctgtc	ttcaggtacc	12900
	agctgggtag	tggggaggcc	cgctgggtct	ctgaggaccc	catcaatgac	ggcgagtggc	12960
	accgggtgac	agcactgcgg	gaggggccga	gaggttccat	ccaagtcgac	ggtgaggagc	13020


```

tggtcagcgg ccggtcccca ggtcccaacg tggcagtc aa cgccaagggc agcgtctaca 13080
tcggcgggagc ccctgacgtg gccacgctga ccggggggcag attctctctcg ggcacacacag 13140
gctgtgtgcaa gaacctgggtg ctgcactcgg ccggacccgg cgccccgccc ccacagcccc 13200
tggacctgca gcaccgcgcc caggccggggg ccaacacacg cccctgcccc tcgtaggcac 13260
5 ctgcctgccc cacacggact cccggggccac gccccagccc gacaatgtcg agtatattat 13320
tattaatatt attatgaatt tttgtaagaa accgaggcga tgccacgctt tgctgctacc 13380
gccctgggct ggactggagg tgggcatgcc accctcacac acacagctgg gcaaagccac 13440
aaggctggcc agcaaggcag gttggatggg agtgggcacc tcagaaagtc accaggactt 13500
ggggtcagga acagtggctg ggtggggcca gaactgcccc cactgtcccc ctaccacccg 13560
10 atggagcccc cagatagagc tgggtggcct gtttctgcag cccttgggca gttctcactc 13620
ctaggagagc caacctcggc ttgtgggctg gtgccccaca gctacctgag acgggcatcg 13680
caggagtctc tgccaccac tcaggattgg gaattgtctt tagtgccggc tgtggagcaa 13740
aaggcagctc acccctgggc aggcgggtccc catccccacc agctcgtttt tcagcacccc 13800
caccacctc caccagccc ctggcacctc ctctggcaga ctccccctcc taccacgtcc 13860
15 tcttggcctg cattccccacc cctcctgcc agcacacagc ctgggggtccc tccctcaggg 13920
gctgtaaggg aaggcccacc ccaactctta ccaggagctg ctacaggcag agcccagcac 13980
tgatagggcc ccgcccaccg ggccccgccc acccaggccc acatccccac ccatctggaa 14040
gtgaaggccc agggactcct ccaacagaca acggacggac ggatgccgct ggtgctcagg 14100
aagagctagt gccttaggtg ggggaaggca ggactcacga ctgagagaga gaggaggggg 14160
20 atatgaccac cctgccccat ctgcaggagc ctgaagatcc agctcaagtg ccatcctgcc 14220
agtggccccc agactgtggg gttgggacgc ctggcctctg tgcctagaa gggaccctcc 14280
tgtgtgtctt gtcttgattt ttcttaataa acggtgctat ccccgcc 14327

```

25 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 58
 Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly
 1 5 10 15

35 <210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 59
 Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly
 1 5 10

45 <210> 60
 <211> 18
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser
 1 5 10 15
 55 Phe Ser

<210> 61
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 10 Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala Leu Arg Val Ala Val
 1 5 10 15

15 <210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 62
 Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu
 1 5 10 15

25 <210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 63
 Glu Lys Met His Glu Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro
 1 5 10 15

35 Gly

40 <210> 64
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 64
 Asp Leu Gln Asn Phe Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu
 1 5 10

50 <210> 65
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 65
 Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu
 1 5 10 15

Leu Val Arg

5
 <210> 66
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 66
 ttywsntggg ayaaytgytt ygarggnaar gayccngcng tnathmgn 48

15
 <210> 67
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20
 <400> 67
 taywsnytn cnaarwsnga rtygcngtn ccngayytng arytncn 48

25
 <210> 68
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30
 <400> 68
 Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg
 1 5 10 15

35
 <210> 69
 <211> 585
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40
 <400> 69
 gaygcncng gncartaygg ngcntaytty caygaygayg gnttyytngc nttyccnggn 60
 caygtnttyw snmgnwsnyt nccngargtn ccngaracna thgarytna rgtnmgnacn 120
 wsnacngcnw snggnytnyt nytntggcar ggngtgargc tnggngargc nggncarggn 180
 aargayttya thwsnytnng nytnargay ggncayytng tnttymgnta ycarytnggn 240
 45 wsgngngarg cnmgnytngt nwsngargay ccnathaayg ayggngartg gcaymgngtn 300
 acngcnytnm gngarggnmg nmngngnwsn mgncargtn ayggngarga rytngtnwsn 360
 ggnmgnwsnc cnggncnaa ygtngcngtn aaygcnaarg gnwsngnta yathggnggn 420
 gcncngayg tngcnacnyt nacngnggn mgnttywsnw snggnathac nggntgytn 480
 aaraayytng tnytnayws ngcnmgncn ggngcncnc cncncarcc nytngayyt 540
 50 carcaymgng cncargcng ngcnaayacn mgncntgyc cnwsn 585

55
 <210> 70
 <211> 597
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 70

atgaartggg tntgggcnyt nytnytnytn gcngcntggg cngcngcnga rmngnaytgy 60
 mngntnwsnw snttymngt naargaraay ttygayaarg cnmgnttyws nggnacntgg 120
 taygcnatgg cnaaraarga yccngarggn ytnttyytnc argayaayat hgtngcngar 180
 ttywsngtng aygaracngg ncaratgwsn gcnacngcna arggnmngt nmngnytnytn 240
 5 aayaaytggg aygtntgygc ngayatggtn ggnaenttya cngayacnga rgayccngcn 300
 aarttyaara tgaartaytg gggngtngcn wsnttyytnc araarggnaa ygaygaycay 360
 tggathgtng ayacngayta ygayacntay gcngtncart aywsntgymg nytnytnaay 420
 ytngayggna cntgygcnga ywsntaywsn ttygtnttyw snmgngaycc naayggnytn 480
 ccncngarg cncaraarat hgtnmgnear mgncargarg arytntgyyt ngcnmgncar 540
 10 taymgnytna thgtncayaa yggntaytgy gayggnmgnw sngarmgnaa yytnytn 597

<210> 71

<211> 579

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 71

atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytn gnytnytny ngcnacncn 60
 20 gcncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgytty 120
 garggnaarg aycngcngt nathmgwnsn ytnacnytn arcngaycc nathgtngtn 180
 ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnacnwsng tnccnytnws nwsnccnytn 240
 aargtngayy tngtnytna raargargtn gcnggnytn ggathaarat hccntgyacn 300
 gaytayathg gnwsntgyac nttygarcay ttytgygayg tnytngayat gytnathccn 360
 25 acngngarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tnccntgyca ytgyccntty 420
 aargarggna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygcng tnccngayt ngarytnccn 480
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaaringn 540
 ytnggntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579

30 <210> 72

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 72

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro
 1 5 10 15

40 <210> 73

<211>

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45 <400> 73

MQSLMQAPLL IALGLLLATP AQAHKKPSQ
 LSSFSWDNCD EGKDPVIRS LTLEPDIIV
 50 PGNVTL SVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV
 AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP
 TGEPCPEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS
 EFVVPDLELP SWLTGNYRI ESVLSSSGKR
 LGCIIAASLKI

55

<210> 74
<211>
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 74

10

GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ MMMHHMQDQQP KEICALVGFC DEV

15

<210> 75
<211>
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 75

25

**MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE
HIMEDDLDTN ADKQLSFEED IMLMARLTWA
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP**

30

35